

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006730

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-105642
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 5 6 4 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 5 6 4 2

出 願 人
Applicant(s): 株式会社日本触媒
独立行政法人製品評価技術基盤機構

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	P04-0114
【提出日】	平成16年 3月31日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 15/09 C12N 9/88
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台 1－2 5－1 2
【氏名】	株式会社 日本触媒内 市毛 栄太
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台 1－2 5－1 2
【氏名】	株式会社 日本触媒内 仙波 尚
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県木更津市かずさ鎌足 2－5－8
【氏名】	独立行政法人製品評価技 術基盤機構内 四十九 俊彰
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県木更津市かずさ鎌足 2－5－8
【氏名】	独立行政法人製品評価技 術基盤機構内 原山 重明
【特許出願人】	
【識別番号】	0000004628
【氏名又は名称】	株式会社 日本触媒
【特許出願人】	
【識別番号】	301037213
【氏名又は名称】	独立行政法人製品評価技術基盤機構
【代理人】	
【識別番号】	100091096
【弁理士】	
【氏名又は名称】	平木 祐輔
【選任した代理人】	
【識別番号】	100096183
【弁理士】	
【氏名又は名称】	石井 貞次
【選任した代理人】	
【識別番号】	100118773
【弁理士】	
【氏名又は名称】	藤田 節
【選任した代理人】	
【識別番号】	100119183
【弁理士】	
【氏名又は名称】	松任谷 優子
【持分の割合】	50/100
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	015244
【納付金額】	10,500円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0217688

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列において、ヘリックスD3'、ヘリックスA、および β シート2領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる、熱安定性が向上した改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 2】

天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼがキャッサバ (*Manihot esculenta*) またはパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) 由来である、請求項 1 記載の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 3】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、15-28番目、32-36番目、および163-174番目に含まれる少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる、あるいは、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、15-28番目、32-36番目、および162-173番目に含まれる少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる、請求項 1 記載の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 4】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、165、169、172、および173番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる、請求項 1 記載の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 5】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、165番目のアミノ酸を酸性アミノ酸に改変して得られる、改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 6】

配列番号 6、8、または16に示されるアミノ酸配列を有する、改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 7】

30分間の加熱処理によって酵素活性が半減する温度が、天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼにおける該温度と比較して1℃以上高いことを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか1項に記載の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか1項に記載の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項 9】

配列番号 6 または 8 に示されるアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項 10】

請求項 8 または 9 記載のDNAを導入した宿主を培養し、得られる培養物からS-ヒドロキシニトリルリアーゼ活性を有するタンパク質を回収することを特徴とする、改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼの製造方法。

【請求項 11】

天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列において、ヘリックスD3'、ヘリックスA、および β シート2領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸を改変することにより、S-ヒドロキシニトリルリアーゼの熱安定性を向上させる方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規耐熱性S-ヒドロキシニトリルリアーゼ

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な耐熱性S-ヒドロキシニトリルリアーゼに関する。より詳細には、アミノ酸を置換することにより耐熱性が向上したS-ヒドロキシニトリルリアーゼに関する。

【背景技術】

【0002】

S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、青酸とアルデヒド、あるいはケトンとの反応を触媒し、光学活性を有するシアノヒドリン類を生成させる。光学活性シアノヒドリン類は医薬合成の中間体として重要であり、したがってS-ヒドロキシニトリルリアーゼは工業上で重要な酵素といえる。

【0003】

S-ヒドロキシニトリルリアーゼとしては、例えば、キャッサバ (*Manihot esculenta*) 由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) 由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ、またはイネ科植物であるモロコシ (*Sorghum bicolor*) 由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼなどが知られている。しかしながら、酵素を生物より分離するコストが高額であるため、工業的には、天然の酵素に加えて組換え型S-ヒドロキシニトリルリアーゼが汎用されている。

【0004】

組換え型S-ヒドロキシニトリルリアーゼの製造では、酵素活性を損なうことなく、宿主細胞破碎液より当該酵素を分離する工程が必要となる。酵素の分離法としてはイオン交換等のクロマトグラフィーを用いた方法が最もよく知られているが、高コストのため、工業的には加熱による分離法が望ましい。

【0005】

一方、Wagnerらは、パラゴムノキ由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼの結晶構造を解析し、この酵素が α/β ヒドラーゼスーパーファミリーに属することを報告している。この報告によれば、酵素の活性中心はSer80, His235、及びAsp207 からなるCatalytic Triadで構成され、タンパクの奥深くに存在し、狭い疎水性チャンネルで外界につながっている（非特許文献1）。そこで、酵素の基質受容性を改良するために、この疎水性チャンネル内のかさ高いアミノ酸をより小さなアミノ酸に置換した改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼも開発されている（特許文献1）。しかしながら、基質受容性以外を目的としたS-ヒドロキシニトリルリアーゼの改変、特に耐熱性の向上のための改変については、未だ具体的な報告はない。

【0006】

【特許文献1】 特開2000-125886号公報

【非特許文献1】 Wagner UG., et al, Structure. 1996 Jul 15;4(7):p811-22.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、耐熱性の向上した新規S-ヒドロキシニトリルリアーゼを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討し、S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸を遺伝子工学的に置換することで、改変前の酵素に比較して著しく熱安定性の向上した酵素が得られることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明は、天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列において、ヘリックスD3'、ヘリックスA、および β シート2領域に存在する少なくとも1つのアミノ

酸を改変して得られる、熱安定性が向上した改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼに関する。

【0010】

天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼとしては、キャッサバ (*Manihot esculenta*) 由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ (配列番号2) またはパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) 由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ (配列番号4) を挙げることができる。前記キャッサバまたはパラゴムノキ由来の天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼを用いる場合、配列番号2に示されるアミノ酸配列上の15-28番目 (ヘリックスA)、32-36番目 (β シート2)、および163-174番目 (ヘリックスD3')、あるいは、配列番号4に示されるアミノ酸配列上の15-28番目 (ヘリックスA)、32-36番目 (β シート2)、および162-173番目 (ヘリックスD3') に存在する少なくとも1つのアミノ酸を改変することが望ましい。

【0011】

本発明の改変型酵素の一例として、配列番号2に示されるアミノ酸配列上の165、169、172、および173番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼを挙げることができる。

【0012】

なかでも、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、165番目のアミノ酸を酸性アミノ酸に改変して得られる改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、高い熱安定性と有機溶媒耐性を有する。また、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、173番目のアミノ酸をもう一方のモノマーのアミノ酸と近接するように改変して得られる改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼも、高い熱安定性を有する。特に好適な改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼの例として、配列番号6、8、または16に示されるアミノ酸配列を有する改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼを挙げることができる。

【0013】

本発明の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、30分間の加熱処理によって酵素活性が半減する温度が、天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼにおける該温度と比較して1℃以上高いことが望ましい。

【0014】

本発明はまた、本発明の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼをコードするDNAを提供する。そのようなDNAの好適な例として、配列番号6、8、または16に示されるアミノ酸配列をコードするDNAを挙げることができる。

【0015】

本発明はさらに、本発明の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼをコードするDNAを導入した宿主を培養し、得られる培養物からS-ヒドロキシニトリルリアーゼ活性を有するタンパク質を回収することを特徴とする、改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼの製造方法を提供する。

【0016】

さらにまた、本発明は、天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列において、ヘリックスD3'、ヘリックスA、および β シート2領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸を改変することにより、S-ヒドロキシニトリルリアーゼの熱安定性を向上させる方法を提供する。

【発明の効果】

【0017】

本発明の改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、従来の酵素に比較して熱安定性や有機溶媒耐性が著しく向上している。前記改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、酵素活性を損なうことなく、加熱処理により細胞破砕液から低コストで簡便に精製できる。したがって、本発明によれば、S-ヒドロキシニトリルリアーゼの効率的な組換え生産が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明について詳細に説明する。

1. 天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ

本発明において、「天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ（以下、SHNLと略記する）」とは、植物から単離・精製されたSHNL、あるいは当該SHNLと同じアミノ酸配列を有するSHNLを意味する。前記天然型SHNLの由来は特に限定されず、例えば、モロコシ (*Sorghum bicolor*) などのイネ科植物由来のSHNL、キャッサバ (*Manihot esculenta*) やパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) などのトウダイグサ科植物由来のSHNL、キシメニア (*Ximenia americana*) などのボロボロノキ植物由来のSHNL等を挙げることができる。これらSHNLのアミノ酸配列や遺伝子の塩基配列は既に公知であり、GenBank等の公共データベースを通じて容易に入手することができる。例えば、パラゴムノキ由来SHNL遺伝子はAccession No. U40402（配列番号3はU40402のCDSに該当）、キャッサバ由来のSHNL遺伝子はAccession No. Z29091、モロコシ由来SHNL遺伝子はAccession No. AJ421152として、それぞれGenBankに登録されている。

【0019】

2. S-ヒドロキシニトリルリアーゼの立体構造

いくつかのSHNLについては、既にその立体構造が解析がされており、例えば、日本DNAデータバンクのデータベースPDB Retrieverよりデータを取得することができる。こうした立体構造情報によれば、SHNLはホモダイマーを形成し（図7および図11参照）、その活性中心はタンパクの奥深くに存在し、狭い疎水性チャンネルで外界につながっている。

【0020】

SHNLには、ダイマー形成時に他方のSHNLのヘリックスAおよびβシート2と結合する、ヘリックスD3'と呼ばれる領域がある。以下に、キャッサバとパラゴムノキ由来SHNLのヘリックスA、βシート2、およびヘリックスD3'の各アミノ酸配列上の位置を示す。

【0021】

	ヘリックスA	βシート2	ヘリックスD3'
キャッサバSHNL	15-28	32-36	163-174
パラゴムノキSHNL	15-28	32-36	162-173

（上記各番号は配列表の各配列上のアミノ酸番号を示す）

【0022】

上記に示すよう、ヘリックスD3'は、配列番号2に示されるキャッサバ由来のSHNLのアミノ酸配列においては163-174番目のアミノ酸に、配列番号4に示されるパラゴムノキ由来のSHNLのアミノ酸配列においては、162-173番目のアミノ酸に該当する。

【0023】

図13は、キャッサバ (*Manihot esculenta*) およびパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) 由来のSHNLのアミノ酸配列をアラインメントしたものである。両SHNLのアミノ酸の相同性は74%であり、個々のアミノ酸は必ずしも完全に同一ではない。例えば、パラゴムノキ由来のSHNLでは、キャッサバ由来のSHNLの139番に該当するアミノ酸が欠失しているため、ヘリックスD3'領域のアミノ酸番号が1つずれている。しかしながら、いずれもα/βヒドrolラーゼスーパーファミリーに属し、他植物種由来のSHNLを含めて、その立体構造は類似している。

【0024】

本発明において、「ヘリックスD3'」とは、SHNLがダイマーを形成する際に他方のSHNLモノマーの「ヘリックスA」および「βシート2」と結合する領域であって、SHNLの熱安定性や酵素活性に深く関与する領域である。具体的には、「ヘリックスD3'」領域は、配列番号2に示されるキャッサバ由来のSHNLのアミノ酸配列の163-174番目や配列番号4に示されるパラゴムノキ由来のSHNLのアミノ酸配列の162-173番目のアミノ酸に該当する領域、あるいは他の植物由来のSHNLにおいて前記アミノ酸に相当する領域である。他の植物由来のSHNLにおけるヘリックスD3'の位置は、そのSHNLのアミノ酸配列を上記配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列とアラインメントし、配列番号2または配列番号4の162-173番目のアミノ酸に対応する領域として求めることができる。

【0025】

本発明にかかる「ヘリックスA」領域は、具体的には、配列番号2に示されるキャッサバ由来のSHNLや配列番号4に示されるパラゴムノキ由来のSHNLのアミノ酸配列において、15-28番目のアミノ酸に該当する領域、あるいは他の植物由来のSHNLにおいて前記アミノ酸に相当する領域である。他の植物由来のSHNLにおけるヘリックスAの位置は、そのSHNLのアミノ酸配列を上記配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列とアラインメントし、配列番号2または配列番号4の15-28番目のアミノ酸に対応する領域として求めることができる。

【0026】

本発明にかかる「βシート2」領域は、具体的には、配列番号2に示されるキャッサバ由来のSHNLや配列番号4に示されるパラゴムノキ由来のSHNLのアミノ酸配列において、32-36番目のアミノ酸に該当する領域、あるいは他の植物由来のSHNLにおいて前記アミノ酸に相当する領域である。他の植物由来のSHNLにおけるヘリックスD3'の位置は、そのSHNLのアミノ酸配列を上記配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列とアラインメントし、配列番号2または配列番号4の32-36番目のアミノ酸に対応する領域として求めることができる。

【0027】

3. 改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ

本発明は、天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列において、ヘリックスD3'、ヘリックスAおよびβシート2領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる、熱安定性が向上した改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼに関する。

【0028】

ここで、「アミノ酸の改変」とは、アミノ酸を別種のアミノ酸に改変することを意味する。改変は、アミノ酸を相互に置換することのほか、適当な置換基や修飾の導入によって改変するものであってもよい。

【0029】

アミノ酸の置換は、周知の方法に従い、当該アミノ酸配列をコードする遺伝子に部位特異的変異を導入すればよい。そのような部位特異的変異は、市販のキット（例えば、QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE)、Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit (CLONTECH) 等）を用いて容易に行うことができる。

【0030】

本発明において、「熱安定性が向上した」とは、改変型SHNLを加熱した後に室温に戻して得られる酵素活性が、同じく加熱処理した天然型SHNLの酵素活性と比較して多く残存していることを意味する。具体的にいえば、30分間の加熱処理によって改変型SHNLの酵素活性が半減する温度が同活性値、同タンパク質濃度に調整された天然型SHNLにおける該温度と比較して少なくとも1℃以上高いことを意味する。また、30分間の加熱処理によって改変型SHNLの酵素活性が半減する温度が、同活性値、同タンパク質濃度に調整された天然型SHNLにおける該温度と比較して1℃上昇したことを「熱安定性／耐熱性が1℃向上した」と表現する。具体的にいえば、30分間の加熱処理によって酵素活性が半減する温度が、天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼにおける該温度と比較して少なくとも1℃以上高いことを意味する。本発明の改変型SHNLは、こうした耐熱性に加えて、有機溶媒に対する耐性も高く、工業的生産工程において非常に有用な酵素といえる。

【0031】

本発明においては、一方のSHNLモノマーのヘリックスD3'領域のアミノ酸と他方のSHNLモノマーのヘリックスAおよびβシート2領域のアミノ酸を最適化し、酵素の熱安定性を向上させる。酵素の熱安定性を向上させる有効な手段の一つとして、オリゴマー形成力を強化する方法が考えられる。本発明においては、一方のSHNLモノマーのヘリックスD3'領域のアミノ酸と他方のSHNLモノマーのヘリックスA、βシート2領域のアミノ酸を最適化し、酵素の熱安定性を向上させる。SHNLのダイマー形成には相互のモノマーのアミノ酸残基のイオン結合や疎水性相互作用が関与していると思われるが、このような要因が有効にはた

らくのはアミノ酸残基間の距離が2～5オングストロームまでと思われる。したがって、改変させるアミノ酸は、特にその10オングストローム以内（10オングストローム以内であればアミノ酸の改変によりアミノ酸残基間の距離を最適化する）に、もう一方のモノマーのヘリックスD3'領域、あるいはヘリックスA、βシート2領域のアミノ酸残基が存在するようなアミノ酸であることが好ましい。そのようなアミノ酸は、ヘリックスD3'領域であれば、配列番号2に示される164～166、および168～173番目のアミノ酸である。

【0032】

本発明の改変型SHNLの好適な一例として、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、165番目のグリシンを、酸性アミノ酸、例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸に置換して得られるS-ヒドロキシニトリルリアーゼ（それぞれ、配列番号6および8）、あるいは173番目のバリンをロイシンに置換して得られるS-ヒドロキシニトリルリアーゼ（配列番号16）を挙げることができる。これらの改変型SHNLは、天然型SHNLと比較して、酵素活性が半減する温度が5℃以上向上した優れた耐熱性酵素であるとともに、有機溶媒に対する耐性を有するため、工業的生産工程において非常に有用な酵素である。

【0033】

4. 改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼの製造

4.1 改変型SHNLをコードするDNA

本発明にかかる改変型SHNLタンパク質をコードするDNAは、公知の天然型SHNL遺伝子に、部位特異的変異を導入して得られる。すなわち、置換部位のコドンを目的とするアミノ酸をコードするコドンに改変しうるプライマーを設計し、該プライマーを用いて天然型SHNLをコードするDNAを鋳型としてPCRを行えばよい。部位特異的変異導入は、市販のキット（例えば、QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE)、TransformerTM Site-Directed Mutagenesis Kit (CLONTECH) 等）を用いて容易に行うことができる。

【0034】

4.2 組換えベクター

次いで、前記改変型SHNLをコードするDNAをプラスミド等の公知のベクターに連結（挿入）して組換えベクターを作製する。前記ベクターは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。

【0035】

前記プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば pBR322, pBR325, pUC18, pUC119, pTrcHis, pBlueBacHis 等、特に強力なT7プロモーターを有するpET21ベクターが好ましい）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110, pTP5 等）、酵母由来のプラスミド（例えば YEpl3, YEpl24, YCp50, pYE52 等）などが、ファージDNAとしてはλファージ等が挙げられる。

【0036】

前記ベクターへの本発明の遺伝子の挿入は、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、ベクターDNAの適当な制限酵素部位またはマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法が採用される。

【0037】

宿主内で外来遺伝子を発現させるためには、構造遺伝子の前に、適当なプロモーターを配置させる必要がある。前記プロモーターは特に限定されず、宿主内で機能することが知られている任意のものを用いることができる。なおプロモーターについては、後述する形質転換体において、宿主ごとに詳述する。また、必要であればエンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列（SD配列）、ターミネーター配列等を配置させてもよい。

【0038】

4.3 改変型SHNL発現系（形質転換体）

次いで、前記組換えベクターを目的遺伝子が発現しうるように宿主中に導入し、改変型SHNL発現系を作製する。ここで宿主としては、本発明のDNAを発現できるのもであれば特に限定されず、例えば、エッシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）等のエッシェリヒア

属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ (*Rhizobium meliloti*) 等のリゾビウム属に属する細菌、またサッカロミセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、チゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等の酵母、その他COS細胞、CHO細胞等の動物細胞、あるいはSf19、Sf21等の昆虫細胞を挙げることができる。

【0039】

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HMS174 (DE3)、K12、DH1、B株等が挙げられ、枯草菌としては、例えば、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MI 114、207-21等が挙げられる。プロモーターとしては、大腸菌等の上記宿主中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージに由来するプロモーターが挙げられる。また、tacプロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、特に限定されず、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110-2114 (1972)] や、エレクトロポレーション法等が挙げることができる。

【0040】

酵母を宿主とする場合は、例えば、サッカロミセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、ピキア・パストリス等が用いられる。プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等を挙げることができる。酵母へのベクターの導入方法は、特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法 [Becker, D.M. et al.: Methods. Enzymol., 194: 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法 [Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法 [Itoh, H.: J. Bacteriol., 153: 163-168 (1983)] 等を挙げることができる。

【0041】

4. 4 形質転換体の培養

本発明の改変型SHNLは、本発明の形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から該酵素活性を有するタンパク質を採取することによって得ることができる。本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主に応じて、適宜決定される。例えば、大腸菌や酵母等の微生物を宿主とする形質転換体の場合は、微生物が質化しうる炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体を効率的に培養しうる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いても良い。

【0042】

培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加しても良い。プロモーターとして誘導性のものを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加しても良い。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加しても良い。

【0043】

培養後、本発明の酵素タンパク質が菌体内または細胞内に生産される場合は、菌体内または細胞を破砕する。一方、本発明のタンパク質が菌体外または細胞外に分泌される場合は、培養液をそのまま用いるか、遠心分離等によって回収する。

【0044】

タンパク質の単離・精製には、例えば硫酸沈殿、SDS-PAGE、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独であるいは適宜組み合わせ用いればよい。

【0045】

本発明の改変型SHNLの酵素活性は、基質となりうる適当なシアン化合物とアルデヒド、あるいはケトンを含む反応液に該酵素を添加し、生成する光学活性シアノヒドリンを検出することにより確認することができる。光学活性シアノヒドリンの確認は、例えば、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を用いることができる。あるいは、本発明の改変型SHNLに特異的に結合する抗体を作製し、該抗体を用いたウェスタンブロッティングによって発現を確認することもできる。例えば、SHNLの酵素活性は、マンデロニトリルのSHNLによる分解によって生じるアルデヒドの単位時間あたりの生成量（波長249.6nmにおける吸光度から算出）を測定することによって確認できる。

【0046】

SHNLを精製する際には通常イオン交換クロマトグラフィー等の操作が必要であるが、本発明の改変型SHNLは加熱処理を行うことで、遠心分離などの操作により酵素活性を保持したまま宿主（大腸菌）に由来するタンパク質を除去することができる。したがって、本発明の改変型SHNLは低コストで簡便に精製を行うことが可能であり、酵素の組換え生産効率を著しく向上させることができる。

【0047】

本発明の改変型SHNLの製造法としては、例えば、特開平10-373246号、特開平10-373248号、特開平11-367251号を参考にすることができる。

【0048】

5. 改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼによる光学活性シアノヒドリンの合成

本発明の改変型SHNLは、耐熱性、有機溶媒耐性が高いにもかかわらず、天然型SHNLと同等の生産効率および光学純度で光学活性シアノヒドリンを合成できる。本発明の改変型SHNLを用いた光学活性シアノヒドリンの合成は、天然型SHNLと全く同様の方法で実施できる。工業的生産工程において、改変型SHNLとしては固定化酵素を用いてもよい（例えば、特開2002-176974号参照）。本発明の改変型SHNLを用いたシアノヒドリンの好適な合成方法としては、例えば、特開2002-355085号、特開2002-176974号、特開2001-363840号、特開2001-346596号、特開2001-190275号、特開2000-245286、特開2001-120289号、特開2000-217590号等に記載された方法を挙げることができる。

【実施例】

【0049】

以下、実施例を用いて本発明についてより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1：改変酵素Actmt-001f2-SHNLの調製

【0050】

1. 変異導入

キャッサバ (*Manihot esculenta*) 由来のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ (Original SHNL) 遺伝子 (配列番号1：特願2002-365675) への変異導入はGeneMorphTM PCR Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製) を用いて行った。鋳型として、pKK223-3 (アマシャム・バイオサイエンス社製) のマルチクローニングサイトにOriginal SHNLが組み込まれているpKK223-3/Original SHNLプラスミド600ngを用い、下記のオリゴDNAをプライマーとして、PCRを行った。

Forward primer: 5'-GGG GAA TTC ATG GTT ACT GCA CAC TTC GTT CTG ATT CAC-3' (配列番号9)

Reverse primer: 5'-GGG AAG CTT TTA AGC GTA TGC ATC AGC AAC TTC TTG CAG-3' (配列番号10)

【0051】

2. 形質転換

得られたPCR産物 (SHNL Mutants) を制限酵素EcoR I、Hind III (TOYOBO社製) を用いて消化し、同じく制限酵素EcoR I、Hind IIIによりマルチクローニングサイトが消化されているベクターpKK223-3とライゲーションを行った。ライゲーションにはLigaFastTMRapid DNA Ligation System (Promega社製) を用いた。ライゲーション反応液をコンピテントセルDH5 α (TOYOBO社製) に形質転換し、複数のDH5 α /pKK223-3/SHNL-Actmtを得た。

【0052】

3. 選抜および高発現ベクターへの組換え

複数のDH5 α /pKK223-3/SHNL-Actmtを試験管で培養し、培養液をそれぞれ1mLずつ取り、遠心分離を行って上清を除去し、細胞ペレットを得た。得られた細胞をクエン酸ナトリウムバッファー (pH5.5) 200 μ Lで再懸濁した後、超音波細胞破碎機で細胞を破碎した。細胞破碎物を15000rpm、5minの条件で遠心分離し、細胞破碎液を得た。この細胞破碎液を60℃、2hの条件で加熱し、加熱後にそれぞれの細胞破碎液のSHNL活性を測定した。SHNL活性は、反応温度20℃においてマンデロニトリルのSHNLによる分解によって生じるアルデヒドの単位時間あたりの生成量から算出した。なお、アルデヒドの単位時間あたりの生成量は、波長249.6nmにおける吸光度を測定すること (島津製作所製 分光光度計使用) によって算出される。

【0053】

この結果、加熱後も活性を有していたDH5 α /pKK223-3/SHNL-Actmt001f2を耐熱株として選抜した。選抜された株をコロニーPCRし、得られたPCR産物を鋳型としてシーケンス反応を行った。反応物の解析結果より、DH5 α /pKK223-3/SHNL-Actmt001f2は配列番号1に示される塩基配列の494番目のグリシンがアデニンに改変された塩基配列 (配列番号5) を有することが確認された。したがって、SHNL-Actmt001f2はOriginal SHNLのアミノ酸配列 (配列番号2) の165番目のグリシンがアスパラギン酸へ置き換えられたアミノ酸配列 (配列番号6) を有する改変型SHNLであることが確認された。以下、この改変型SHNL (165Gly \rightarrow Asp) をActmt-001f2-SHNLと呼ぶ。

【0054】

次に、SHNL-Actmt001f2遺伝子をタンパク質高発現ベクターpET21 (Novagen社製) へ導入した。pKK223-3/SHNL-Actmt001f2プラスミドを調製し、これを鋳型として、下記のプライマーとDNAポリメラーゼKODplus (TOYOBO社製) を用いてPCRを行うことで、鋳型の両末端に付加されている制限酵素サイトEcoR I、Hind IIIを除き、代わりに制限酵素サイトNde I、BamH Iを付加した。

Forward primer: 5'-GGG GGG GGG CAT ATG GTT ACT GCA CAC TTC GTT CTG ATT CAC AC-3'
(配列番号11)

Reverse primer: 5'-GGG GGA TCC TTA AGC GTA TGC ATC AGC AAC TTC TTG CAG-3' (配列番号12)

【0055】

得られたPCR産物を制限酵素Nde I (New England Bio Labs社製)、BamH I (TOYOBO社製) を用いて消化し、同じく制限酵素Nde I、BamH Iによりマルチクローニングサイトが消化されているベクターpET21a (Novagen社製) とライゲーションを行った。ライゲーションにはLigaFastTMRapid DNA Ligation System (Promega社製) を用いた。ライゲーション反応液をコンピテントセルBL21-DE3 (Novagen社製) に形質転換し、165番目のアミノ酸がAspに置換されたSHNLの発現系BL21 (DE3)/pET21a/SHNL-Actmt001f2を得た。

【0056】

実施例2: SHNL-Actmt001f2の熱安定性実験

1. 実験方法

1) 酵素液の調製

実施例1で作製した大腸菌BL21 (DE3)/pET21a/Original SHNL、BL21 (DE3)/pET21a/SHNL-Actmt001f2をLB培地5mLを用いて37℃で12h培養した。得られた培養液100 μ Lを下記に示すNS-2培地5mLに接種し、IPTGを添加して20℃、60hで培養を行った。培養終了後培養液を遠心分離し、細胞を回収した。この細胞を0.2Mクエン酸Na buffer (pH5.5) に懸濁し、超音波

により細胞を破碎した。この破碎液を遠心分離し、上清を回収しOriginal SHNL、Actmt-001f2-SHNL酵素液を得た。酵素液はOriginal SHNLが活性値74U/mL、タンパク質濃度6.29mg/ml、Actmt-001f2-SHNLが活性値69U/mL、タンパク質濃度5.96mg/mlであった。

【0057】

【表1】

〔NS-2 培地組成 (pH6) 〕	
Glycerol	40g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10g
KH ₂ PO ₄	2g
K ₂ HPO ₄	6g
Yeast Ext	40g
MgSO ₄	1g
アデカノール	20 滴
合計	1L (蒸留水により合計 1L に調整)

上記を加熱滅菌した後、フィルター滅菌したアンピシリン 100mg/L (終濃度)、及びフィルター滅菌した IPTG 238mg/L (終濃度) を添加する。

【0058】

2) 酵素液の加熱処理

Original SHNL、Actmt-001f2-SHNL酵素液200μLをエッペンドルフチューブに入れ、ヒートブロックにより酵素液温が45～70℃となるよう加熱した。30min後に遠心分離し、サンプルを回収し、開始時の酵素活性に対する残存活性を測定した。酵素活性の測定は実施例1に記載したとおりである。

【0059】

2. 実験結果

この結果、Original SHNLでは温度65℃において活性が半減したのに対し、Actmt-001f2-SHNLは90%以上の残存活性を示した(図1)。Actmt-001f2-SHNLについて活性の半減がみられたのは70℃付近で、Original SHNLと比較して約5℃の耐熱性向上が見られた。この結果より、キャッサバ由来のSHNLでは、165番目のアミノ酸がグリシンからアスパラギン酸へ置換されることにより、熱に対する安定性が向上することが明らかとなった。

【0060】

加熱後の酵素液サンプルをSDS-PAGEにより解析した(図2)。サンプルは前述のように加熱後遠心分離されているため、熱により変性し、水に不溶となったタンパク質は除去されている。

【0061】

図2に示すよう、Original SHNLにおいては、加熱温度60℃より酵素量(図2の矢印部分のバンド 参照)が急激に減少し、70℃ではバンドがほぼ消滅している。一方、Actmt-001f2-SHNLにおいても、酵素量の減少はみられるが、70℃においても酵素は十分残存している。このSDS-PAGEの結果は、酵素活性の測定結果(図1)と一致している。

【0062】

図3に加熱によるサンプル中のタンパク質濃度の変化を示す。45℃のサンプルではホストである大腸菌に由来するタンパク質が多く認められる(図2および図3)が、このタンパク質も加熱により変性し不溶化するため、加熱温度の上昇と共にサンプル中から除去される。そのため、サンプル中のタンパク質濃度はOriginal SHNLとActmt-001f2-SHNLのいずれについても、加熱温度の上昇に伴いほぼ直線的に減少した。

【0063】

一般に、酵素を精製する際にはゲルろ過クロマトグラフィー等の操作が必要であるが、

Actmt-001f2-SHNLは加熱処理を行うことで、遠心分離などの操作により酵素活性を保持したまま大腸菌に由来するタンパク質を除去することができる。したがって、Actmt-001f2-SHNLは低コストで簡便に精製を行うことが可能であると考えられた。

【0064】

実施例3：Actmt-001f2-SHNLの60℃加熱処理における安定性、およびタンパク濃度変化の検討

加熱処理により、酵素活性を保持したまま大腸菌に由来するタンパク質を除去することが実際に可能であることを確認するため、次の実験を行った。

【0065】

1. 実験方法

1) 酵素液の調製

大腸菌BL21(DE3)/pET21a/Original SHNL、BL21(DE3)/pET21a/SNHL-Actmt001f2をLB培地5mLを用いて37℃で12h培養。得られた培養液100μLをNS-2培地5mLに接種し、IPTGを添加して20℃、60hで培養を行った。培養終了後培養液を遠心分離し、細胞を回収した。この細胞を0.2M クエン酸Na buffer(pH5.5)に懸濁し、超音波により細胞を破碎した。この破碎液を遠心分離し、上清を回収しOriginal SHNL、Actmt-001f2-SHNL酵素液を得た。酵素液の濃度はOriginal SHNLが活性値83U/mLタンパク質濃度7.01mg/ml、Actmt-001f2-SHNLが活性値81U/mLタンパク質濃度6.65mg/mlであった。

【0066】

2) 酵素液の加熱処理

Original SHNL、Actmt-001f2-SHNL酵素液200μLをエッペンドルフチューブに入れ、ヒートブロックにより酵素液温が60℃となるよう加熱した。30min毎に遠心分離し、サンプルを10μLずつ回収し、残存活性、タンパク濃度を測定した。

【0067】

2. 実験結果

1) 残存活性

Original SHNLは加熱時間1.5hで活性が半減したのに対し、Actmt-001f2-SHNLは加熱時間1.5hでも75%の活性が残存していた(図4)。

【0068】

2) タンパク濃度変化

得られたサンプルをSDS-PAGEにより解析した。SDS-PAGEの結果(図5)から、0h(加熱なし)の状態では大腸菌に由来するタンパク質が多く混合しているが、加熱後のサンプルでは、Original SHNLもActmt-001f2-SHNLも、大腸菌に由来するタンパク質がサンプル中から除去されていることが明らかとなった。

【0069】

加熱時間1hにおけるActmt-001f2-SHNLサンプル中のタンパク質濃度は4.25mg/mLであり、初期の64%まで減少していた(表2)。一方、加熱時間1hにおけるActmt-001f2-SHNLの残存活性は80%以上であった。したがって、Actmt-001f2-SHNLは、加熱処理により酵素活性を保持したまま大腸菌に由来するタンパク質を除去できることが明らかになった。Original SHNLについては、1hにおけるタンパク質濃度が4.21mg/mLであり、初期の63%まで減少したものの残存活性は60%まで減少した。

【0070】

【表 2】

60℃加熱処理における安定性、およびタンパク濃度 (mg/mL-sample) 変化

加熱時間	Original SHNL		Actmt-001f2-SHNL	
0h	7.01		6.65	
1h	4.21	(61)	4.25	(83)
2h	3.37	(35)	4.14	(73)

* 括弧内はその時点での残存活性 (%)

【0071】

以上より、Original SHNLは、60℃の加熱処理では他の共雑タンパク質と共に変性、失活してしまうため、この温度以上の加熱処理による分離精製は困難であることがわかった。なお、45℃～55℃の範囲で加熱処理することも可能であるが、図3から明らかなように、この温度範囲では共雑タンパク質の変性が極めて緩やかであるため、十分な分離精製を行うためには、かなりの時間を要することになる。

【0072】

実施例4：Actmt-001f2-SHNLの有機溶媒耐性

一般に、酵素の熱安定性と他の環境ストレス、例えば有機溶媒などに対する安定性には高い関連性がある。したがって、Actmt-001f2-SHNLは有機溶媒に対する安定性も向上している可能性がある。このためActmt-001f2-SHNLの有機溶媒耐性に関する検討を行った。

【0073】

1. 実験方法

1) 酵素液の調製

実施例2と同様の方法で酵素液を調製した。ストレスに対する酵素の耐性を測定する場合、サンプル中の共雑タンパク質が保護剤として働き、見かけ上耐性が向上する場合がある。したがって上記のサンプルをそれぞれ牛血清アルブミンおよびバッファーで希釈し、全てのサンプルを活性値44.19 (U/mL)、比活性値6.50 (U/mg)で揃え、共雑タンパク質の影響を実験系から排除した。

【0074】

2) 有機溶媒処理

有機溶媒としてエタノールおよび酢酸エチルを用い、これを酵素液に添加した。エタノールの終濃度は30%、酢酸エチルは40%とした。その後サンプルを攪拌しながら50時間保持した。数時間毎に遠心分離を行い、上清をサンプルとして10μL取り、活性測定を行った。

【0075】

2. 実験結果

Actmt-001f2-SHNLはOriginal SHNLと比較して、エタノールに対しては同等の耐性であったが(図6A)、酢酸エチルに対しては耐性を有することが明らかとなった(図6B)。

【0076】

実施例5：Actmt-001f2-SHNLによる光学活性シアノヒドリンの製造

SHNLはアルデヒドおよびケトンと青酸の反応を触媒し、光学活性なシアノヒドリンを合成する酵素である。Actmt-001f2-SHNLの上記反応に対する触媒能を、Original SHNLとの比較により検討した。

【0077】

1. 実験方法

1) 酵素液調製

BL21(DE3)/pET21a/Original SHNLおよびBL21(DE3)/pET21a/SHNL-Actmt001f2を培養し、

培養液を遠心分離して上清を除去し、細胞ペレットを得た。この細胞ペレット0.33gにクエン酸ナトリウムバッファー（pH5.5）0.66gを加えて再懸濁した後、超音波細胞破碎機で細胞を破碎した。細胞破碎物を15000rpm、5minの条件で遠心分離し、細胞破碎液を得た。この細胞破碎液を50℃、3hの条件で加熱し、加熱後に細胞破碎液を遠心分離した。この上清を0.45μmフィルターでろ過した後、限外ろ過濃縮した。これらの濃縮酵素液にクエン酸ナトリウムバッファー（pH5.5）を加え、両者の活性を下表のように揃えた。調製した酵素液0.3mlをシリカゲル300mgと混合し、固定化酵素を得た。

【0078】

【表3】

酵素名	活性値(U/mL)	比活性(U/mg)
Original SHNL	250	31.02
Actmt-001f2-SHNL	250	27.16

【0079】

2) 酵素反応

1.61MのHCNを溶解したt-ブチルメチルエーテル4.492mlに0.2Mクエン酸バッファー（pH5.5）0.337mlを加え、30分間攪拌した後、静置し水相を除去した。この溶液を上記で調製した固定化酵素300mgを入れた9mlのスクリーバイアルへ添加した。ここにベンズアルデヒド0.508mlを添加し、ボトルローラーで攪拌することにより酵素反応を実施した。反応開始1時間後に反応液4mlを回収した。引き続き同じ処理を行ったHCN／t-ブチルメチルエーテル溶液を同量添加し、ベンズアルデヒドを同量添加して、酵素反応を行った。反応開始1時間後に反応液5mlを回収した。この反応操作を繰り返し行い、計11回の酵素反応を行った。11回目では、酵素反応経過を測定するため、反応時間を延長し、経過分析を行った。

【0080】

2. 実験結果

耐熱性酵素 Actmt-001f2-SHNLは、Original SHNLと同じ反応速度でS-マンデロニトリルを生成した。この結果から、Actmt-001f2-SHNLは光学活性シアノヒドリン合成においてOriginal SHNLと同等の能力を有していることが明らかとなった。反応を繰り返すことにより、両者ともに反応速度が徐々に低下してきたが、反応速度の減少度合いはActmt-001f2-SHNLの方が緩やかであった。（図8A）。

【0081】

反応11回目の反応経過を比較したところ、Actmt-001f2-SHNLの方が反応速度が10%程度高くなった（図8B）。この原因として、耐熱性酵素Actmt-001f2-SHNLは、耐熱性だけではなく、酵素反応系での安定性も向上している可能性があると考えられた。

【0082】

3. 結論

Actmt-001f2-SHNLはOriginal SHNLと同じ生産性、光学純度で光学活性シアノヒドリンを合成できることが明らかとなった。更に繰り返し反応においては、10%程度の寿命延長が認められた。

【0083】

実施例6：BL21(DE3)/pET21a/SHNL-165Gluの作製

耐熱性酵素SHNL-Actmt001f2はそのアミノ酸配列の165番目が酸性アミノ酸のアスパラギン酸に置き換えられていた。そこで、165番目のアミノ酸を、同じ酸性アミノ酸であるグルタミン酸で置換したSHNL（塩基配列：配列番号7、アミノ酸配列：配列番号8）の発現系BL21(DE3)/pET21a/SHNL-165Gluを作製した。

【0084】

1. 変異導入

実施例1と同様、165番目のアミノ酸の改変には、QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いた。鋳型としてpET21a/Original SHNLプラスミド10

ng を用い、下記のオリゴDNAをプライマーとして、PCRを行った。次に得られたPCR産物をキット付属の制限酵素Dpn Iで消化した。

Forward primer: 5' -CGT GAA AAC CTG TTC ACC AAA TGC ACT GAT GAA GAA TAT GAA CTG GCA AAA ATG-3' (配列番号13)

Reverse primer: 5' -CAT TTT TGC CAG TTC ATA TTC TTC ATC AGT GCA TTT GGT GAA CAG GTT TTC ACG-3' (配列番号14)

【0085】

2. 形質転換

得られた制限酵素処理済PCR産物をキット付属のコンピテントセルXL-10Goldに形質転換し、得られた株をコロニーPCRした。このPCR産物を鋳型としてシーケンス反応を行い、反応物を解析解析することで塩基配列494-495番目のGCがAAに改変されている株を選抜した。この株よりプラスミドpET21a/SHNL-165Gluを調製し、コンピテントセルBL21-DE3 (Novagen社製) に形質転換を行い、165番目のアミノ酸がGluに置換されたSHNLの発現系BL21(DE3)/pET21a/SHNL-165Gluを作製した。

【0086】

実施例7：置換部位のアミノ酸種による耐熱性の変化

SHNLのアミノ酸配列165番目を様々な極性のアミノ酸に置換し、それがSHNLの耐熱性にどのように影響するのかを確認した。

【0087】

1. 実験方法

実施例1および実施例6にしたがい、QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE) を用いて165Glyへの変異導入を行い、以下の変異株を作製した。

i) DH5 α /pKK223-3/ Actmt001f2-Glu (165アミノ酸がグルタミン酸に置換)

ii) DH5 α /pKK223-3/ Actmt001f2-Lys (165アミノ酸がリジンに置換)

iii) DH5 α /pKK223-3/ Actmt001f2-Arg (165アミノ酸がアルギニンに置換)

iv) DH5 α /pKK223-3/ Actmt001f2-Ala (165アミノ酸がアラニンに置換)

グルタミン酸はアスパラギン酸と同様、酸性残基を持つアミノ酸である。リジン、アルギニン酸は塩基性であり、アラニンはグリシンと同様中性アミノ酸である。これら4株と、DH5 α /pKK223-3/ Actmt001f2-SHNLおよびOriginal SHNLを合わせた合計6株を用いて、実施例2と同様の方法で加熱試験を行った。

【0088】

2. 実験結果

実施例2にしたがって加熱試験を行った結果、改変SHNLは導入されたアミノ酸残基の性質の違いにより、大きく3つの耐熱性パターンを示した(図9)。

1) 塩基性アミノ酸(Arg、Lys)への置換:

30minで活性がほぼ完全に消滅。Original SHNLと比較して明らかに耐熱性が低下した。

2) 中性アミノ酸(Ala)への置換:

Original SHNL(165Gly、中性)と同様の傾向で耐熱性が低下した。

3) 酸性アミノ酸(Glu)への置換:

Actmt-001f2-SHNL(165Asp、酸性)とほぼ同じパターンで活性が変化した。3種のアミノ酸グループの中で、最も高い耐熱性を示した。

【0089】

以上の結果より、165番目のアミノ酸が酸性アミノ酸に置換された改変SHNLでは耐熱性が向上し、塩基性アミノ酸に置換された改変SHNLでは逆に耐熱性が大きく減少することが明らかとなった。

【0090】

図10にSHNLの三次元構造を示す(図中赤い部分は165Gly、黒い部分は21Lysを示す)。SHNLはホモダイマーとして存在し、Wagnerらの報告(Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis Structure 1996 Vol14 No7)によれば、165GlyはD3' (162-173) と呼ばれるヘリックスの構成アミノ酸

である。D3'はSHNLがダイマーを形成する時、他方のSHNLモノマーのヘリックスA(15-28)およびβシート2(32-36)と結合する領域である。Gly→Aspへの変化により、D3'がーの電荷を帯び、ヘリックスAおよびβシート2の十のアミノ酸残基(20His、21Lys、23Lys)との結合力が増強され、ダイマー形成が安定化することが耐熱性向上に一部で寄与した可能性が考えられた。

【0091】

実施例8：ヘリックスD3'の改変実験

ヘリックスD3'(163-174)の165-173までのアミノ酸と、ヘリックスAの17-21までのアミノ酸とは交差するように配置され、近接している。これらの区間の、他の中性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換することで、耐熱性が変化する可能性がある。ちなみに、ヘリックスD3'の164から169までは、一つ置きに酸性アミノ酸と中性アミノ酸が配置されている。図11のように側鎖を表示して、距離を測定した結果、Leu169はHis20と隣接しており、また172、173もLys23(Trp17、Ala16、Ala35)の近傍に存在することがわかった。そこで、この3つの部位を酸性アミノ酸で置換し、酵素活性(耐熱性)の変化をみた。なお、イオン結合が有効となるのは2~3オングストロームまでの距離であると思われるため、近傍にもう一方のモノマーのヘリックスA側鎖が無い(つまり螺旋構造の裏側に配置されている)163、167は改変しなかった。

【0092】

1. 実験方法

QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いて、SHNL遺伝子のLeu169、Met172、Val173をそれぞれAspおよびGluに置換した。次いで、それぞれの改変遺伝子を実施例1と同様にして、pET21aベクターに連結後、大腸菌E. coli BL21(DE3)に導入し、各変異株を作製した。作製した変異株を培養し、菌体を回収してクエン酸Na Bufferに再懸濁し、超音波で破碎した。この破碎液上清の活性、およびタンパク濃度を測定した。

【0093】

次いで、上記破碎液に牛血清アルブミン、クエン酸Na Bufferを加え、全てのサンプルのタンパク質濃度、活性値、比活性値を揃えた。実施例2および3にしたがい、各改変酵素の耐熱性を測定した(温度60℃で加熱処理し、1h毎に活性測定)。

【0094】

2. 実験結果

1) サンプルの活性値

【表4】

サンプル名	タンパク濃度(mg/ml)	活性値(U/ml)	比活性(U/mg)
Original SHNL	7.74	86.81	11.21
Actmt-001f2-SHNL	7.74	85.68	11.07
172Asp	4.89	55.17	11.29
172Glu	6.24	59.59	9.55
173Asp	4.91	40.31	8.21
173Glu	5.36	46.9	8.74

【0095】

169Asp、Gluは、初期活性は他のサンプルと同等以上であったが、僅かな環境ストレス(凍結、冷蔵等)で急速に失活したため、耐熱性の測定は行わないこととした。酵素の耐熱性を測定する場合、サンプル中の共雑タンパク質が保護剤として働き、見かけ上耐熱性が向上する場合がある。したがって上記のサンプルをそれぞれ牛血清アルブミンおよびバッファーで希釈し、全てのサンプルを活性値28.8(U/mL)、比活性値8.21(U/mg)、タンパ

ク濃度3.5 (mg/mL) で揃え、共雑タンパク質の影響を実験系から排除した。

2) 改変株の耐熱性

Original SHNLのMet172、Val173をAspおよびGluで置換して得られた改変酵素は全て、Original SHNLと比較して著しい耐熱性の低下を示した(図12)。

【0096】

この結果より、今回選択したMet172、Val173の2つの部位は、いずれもSHNLの耐熱性に何らかの関与をしていることが明らかとなった。また、Original SHNLのLeu169をAspおよびGluで置換して得られた改変酵素も著しい安定性の低下を示した。今回の改変箇所である、Original SHNL(配列番号1)のLeu169、Met172、Val173は全て非極性の中性アミノ酸である。これらが極性である酸性アミノ酸へ改変され、耐熱性を喪失したということは即ち、非極性の状態でSHNLの耐熱性に寄与していたと考えられる。

【0097】

推定だが、Leu169、Met172、Val173は隣接する他の非極性アミノ酸との疎水性相互作用に関与していると思われる。立体構造からは、Leu169、Val173はもう一方のダイマーの169、173と比較的近接しており、Met172はヘリックスAとβシート2の残基が形成するポケット状の構造に末端が入り込んでいる。このポケット構造は塩基性アミノ酸とAla16、Trp17、Ala35の非極性アミノ酸で構成されている。Met172はこれら非極性アミノ酸との相互作用により耐熱性に寄与していたと考えられる。以上より、ヘリックスD3'領域に存在するアミノ酸の極性を最適化するように改変することで、SHNLの耐熱性を向上できる可能性が示唆された。

【0098】

上述のとおり、ヘリックスD3'は他方のSHNLモノマーのヘリックスAおよびβシート2の残基と相互作用してSHNLのダイマー形成に寄与する。また、ヘリックスD3'、ヘリックスA、およびβシート2が形成するポケット状構造内の極性はSHNLの酵素活性(耐熱性)に関与していることが示唆された。したがって、これらの領域に存在するアミノ酸の極性を最適化することにより、SHNLの耐熱性や有機溶媒耐性を向上させることができると考えられる。

【0099】

実施例9: BL21(DE3)/pET21a/SD173-le9の作製

SHNLのアミノ酸配列173番目のアミノ酸をValからLeuに置換し、それがSHNLの耐熱性にどのように影響するのかを確認した。

【0100】

1. 変異導入

実施例1および実施例6にしたがい、QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE) を用いて173番目のアミノ酸をLeuに置換したSHNL(配列番号16)を調製した。

【0101】

鋳型としてpET21a/Original SHNLプラスミド10 ng を用い、下記のオリゴDNAをプライマーとして、PCRを行った。次に得られたPCR産物をキット付属の制限酵素Dpn Iで消化した。

Forward primer: 5' -GGC GAA TAT GAA CTG GCA AAA ATG NNN ATG CGC AAG GGC TCT CTG-3' (配列番号17)

Reverse primer: 5' -CAG AGA GCC CTT GCG CAT NNN CAT TTT TGC CAG TTC ATA TTC GCC-3' (配列番号18)

【0102】

2. 形質転換と耐熱性アッセイ

得られた制限酵素処理済PCR産物を同じくキット付属のコンピテントセルXL-10Goldに形質転換し、LB(Amp)プレート上に得られたコロニーを全てLB(Amp)液体培地に懸濁した。この懸濁液よりプラスミドpET21a/SD173-INNNMutantsを調製し、コンピテントセルBL21-DE3(Novagen社製)に形質転換を行いBL21(DE3)/pET21a/SD173-INNNMutants株を作成し

た。

【0103】

複数のBL21(DE3)/pET21a/SD173-1NNNMutants株を試験管で培養し、培養液をそれぞれ1mLずつ取り、遠心分離を行って上清を除去し、細胞ペレットを得た。得られた細胞をクエン酸ナトリウムバッファー (pH5.5) 200 μ Lで再懸濁した後、超音波細胞破碎機で細胞を破碎した。細胞破碎物を15000rpm、5minの条件で遠心分離し、細胞破碎液を得た。この細胞破碎液を60℃、2hの条件で加熱し、加熱後に細胞破碎液それぞれのSHNL活性を測定した。この結果加熱後も活性を有していたBL21(DE3)/pET21a/SD173-1e9他3株を耐熱株として選抜した。選抜された株をコロニーPCRし、得られたPCR産物を鋳型としてシーケンス反応を行った。これら反応物の解析より、BL21(DE3)/pET21a/SD173-1e9は塩基配列517-519番目のGTT(V)がCTG(L)に改変され、173番目のバリンがロイシンに置換されていることが明らかとなった(配列番号15)。他の3株も全て173Val \rightarrow Leuの変異株であった。

【0104】

実施例10: BL21(DE3)/pET21a/SD173-1e9の耐熱性評価

BL21(DE3)/pET21a/SD173-1e9の耐熱性をOriginal SHNLおよびActmtLot001-f2と比較した。

【0105】

1. 実験方法

1) 酵素液の調製

大腸菌BL21(DE3)/pET21a/Original SHNL、BL21(DE3)/pET21a/Actmt-001f2-SHNL、BL21(DE3)/pET21a/SD173-1e9 SHNLをそれぞれLB培地5mlを用いて37℃で12h培養した。得られた培養液100 μ LをNS-2培地5mlに接種し、IPTGを添加して20℃、60hで培養を行った。培養終了後培養液を遠心分離し、細胞を回収した。この細胞を0.2Mクエン酸Na buffer(pH5.5)に懸濁し、超音波により細胞を破碎した。この破碎液を遠心分離し、上清を回収しOriginal SHNL、Actmt-001f2-SHNLおよびSD173-1e9 SHNL酵素液を得た。上記のサンプルをそれぞれ牛血清アルブミン及びバッファーで希釈し、全てのサンプルを活性値17.6 (U/mL)、比活性値4.5 (U/mg)、タンパク濃度3.9 (mg/mL)で揃え、共雑タンパク質の影響を実験系から排除した。

【0106】

2) 酵素液の加熱処理

Original SHNL、Actmt-001f2-SHNL酵素液200 μ Lをエッペンドルフチューブに入れ、ヒートブロックにより酵素液温が45~70℃となるよう加熱した。30min後に遠心分離し、サンプルを回収し、残存活性を測定した(図14)。

【0107】

その結果、上記サンプル条件において、酵素活性が半減した加熱温度はOriginal SHNLが60℃であったのに対し、SD173-1 SHNLおよびActmtLot001-f2では65℃付近であり、Original SHNLに比較して約5℃の耐熱性向上が見られた。以上の結果より、SD173-1 SHNLは、ActmtLot001-f2と同等の耐熱性を有することが明らかとなった。

【0108】

SHNLの173番目のアミノ酸Valは、ダイマー形成時において、もう一方のモノマーのアミノ酸Valと近接している(末端同士の距離が約4.5オングストローム)。Val \rightarrow Leuの置換により、173番目のアミノ酸残基は炭素一つ分伸長することになる。したがって、炭素鎖が互いに伸長することで残基同士の距離が縮まり、非極性アミノ酸残基同士の疎水性相互作用が強まった可能性が高い。

【産業上の利用可能性】

【0109】

本発明の改変型SHNLは、Original SHNLと比較して耐熱性や有機溶媒耐性に優れ、かつOriginal SHNLと同様の生産効率、光学純度で光学活性シアノヒドリンを合成できる。また、本発明の改変型SHNLは低コストで簡便に精製できるため、効率的な組換え生産が可能である。したがって、本発明の改変型SHNLは光学活性シアノヒドリンの工業的生産用酵素と

して極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】図1は、Original SHNLとActmt-001f2-SHNLの熱に対する安定性を比較したグラフである。

【図2】図2は、Original SHNLとActmt-001f2-SHNLの加熱処理サンプルのSDS-PAGEによる解析結果を示す写真である。

【図3】図3は、Original SHNLとActmt-001f2-SHNLの加熱処理サンプルのタンパク質濃度の変化を示すグラフである。

【図4】図4は、Original SHNLとActmt-001f2-SHNLの熱に対する安定性を比較したグラフである。

【図5】図5は、Original SHNLとActmt-001f2-SHNLの加熱処理サンプル（上清）のSDS-PAGEによる解析結果を示す写真である。

【図6】図6は、Actmt-001f2-SHNLの有機溶媒耐性を示すグラフである（A：エタノール耐性、B：酢酸エチル耐性）。

【図7】図7は、Actmt-001f2-SHNLの繰り返し反応における反応1時間目のS-マンデロニトリルの光学純度を示すグラフである。

【図8】図8は、Actmt-001f2-SHNLの繰り返し反応におけるベンズアルデヒド転換率を示すグラフである（A：反応1時間目の転換率の繰り返し回数による変化、B：反応11回目の転換率の経時的変化）。

【図9】図9は、種々の改変型SHNLの加熱による酵素活性の変化を示すグラフである。

【図10】図10は、SHNLの三次元構造を示す図である（赤：165Gly、黒：21Lysを示す）。

【図11】図11は、SHNL dimerの結合部位におけるアミノ酸側鎖配置図を示す（図中、赤：酸性アミノ酸 青：塩基性アミノ酸）。

【図12】図12は、ヘリックスD3領域のアミノ酸を置換した改変型SHNLの加熱による酵素活性の変化を示すグラフである。

【図13】図13は、キャッサバ (*Manihot esculenta*) およびパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) 由来SHNLのアミノ酸配列をアラインメントした図である。

【図14】図14は、Original SHNL、Actmt-001f2-SHNL、SD173-le9の熱に対する安定性を比較したグラフである。

【配列表フリーテキスト】

【0111】

配列番号5—165番のGlyをAspで置換した改変型SHNLをコードするDNA

配列番号6—165番のGlyをAspで置換した改変型SHNL

配列番号7—165番のGlyをGluで置換した改変型SHNLをコードするDNA

配列番号8—165番のGlyをGluで置換した改変型SHNL

配列番号9—人工配列の説明：プライマー

配列番号10—人工配列の説明：プライマー

配列番号11—人工配列の説明：プライマー

配列番号12—人工配列の説明：プライマー

配列番号13—人工配列の説明：プライマー

配列番号14—人工配列の説明：プライマー

配列番号15—173番のValをLeuで置換した改変型SHNLをコードするDNA

配列番号16—173番のValをLeuで置換した改変型SHNL

配列番号17—人工配列の説明：プライマー

配列番号18—人工配列の説明：プライマー

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

Incorporated Administrative Agency,

National Institute of Technology and Evaluation

<120> Novel Thermostable S-Hydroxynitrile lyase

<130> P04-0114

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> Manihot esculenta

<220>

<223> Inventor: Ichige, Eita; Semba, Hisashi; Shijuku, Toshiaki; Harayama, Shigeaki

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (777)

<400> 1

atg	gtt	act	gca	cac	ttc	gtt	ctg	att	cac	acc	att	tgt	cac	ggc	gca	48
Met	Val	Thr	Ala	His	Phe	Val	Leu	Ile	His	Thr	Ile	Cys	His	Gly	Ala	
1				5					10					15		

tgg	att	tgg	cac	aaa	ctg	aaa	ccg	gcc	ctg	gaa	cgt	gct	ggc	cac	aaa	96
Trp	Ile	Trp	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Gly	His	Lys	
			20					25					30			

gtt	act	gca	ctg	gac	atg	gca	gcc	agt	ggc	att	gac	ccg	cgt	caa	att	144
Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Gln	Ile	
		35					40				45					

gaa	cag	atc	aac	tct	ttc	gat	gaa	tac	tct	gaa	ccg	ctg	ctg	act	ttc	192
Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	Leu	Leu	Thr	Phe	
	50					55				60						

ctg	gaa	aaa	ctg	ccg	caa	ggc	gaa	aag	gtt	atc	att	gtt	ggc	gaa	agc	240
Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Gln	Gly	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Val	Gly	Glu	Ser	

65		70		75		80	
tgt gca ggc ctg aac att gct att gct gct gat cgt tac gtt gac aaa	288						
Cys Ala Gly Leu Asn Ile Ala Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Val Asp Lys							
		85		90		95	
att gca gct ggc gtt ttc cac aac tcc ctg ctg ccg gac acc gtt cac	336						
Ile Ala Ala Gly Val Phe His Asn Ser Leu Leu Pro Asp Thr Val His							
		100		105		110	
agc ccg tct tac act gtt gaa aag ctg ctg gaa tcg ttc ccg gac tgg	384						
Ser Pro Ser Tyr Thr Val Glu Lys Leu Leu Glu Ser Phe Pro Asp Trp							
		115		120		125	
cgt gac aca gaa tat ttc acg ttc acc aac atc act ggc gaa acc atc	432						
Arg Asp Thr Glu Tyr Phe Thr Phe Thr Asn Ile Thr Gly Glu Thr Ile							
		130		135		140	
act acc atg aaa ctg ggt ttc gtt ctg ctg cgt gaa aac ctg ttc acc	480						
Thr Thr Met Lys Leu Gly Phe Val Leu Leu Arg Glu Asn Leu Phe Thr							
		145		150		155	
aaa tgc act gat ggc gaa tat gaa ctg gca aaa atg gtt atg cgc aag	528						
Lys Cys Thr Asp Gly Glu Tyr Glu Leu Ala Lys Met Val Met Arg Lys							
		165		170		175	
ggc tct ctg ttc caa aac gtt ctg gct cag cgt ccg aag ttc act gaa	576						
Gly Ser Leu Phe Gln Asn Val Leu Ala Gln Arg Pro Lys Phe Thr Glu							
		180		185		190	
aaa ggc tac ggc tct atc aag aaa gtt tat att tgg acc gat caa gac	624						
Lys Gly Tyr Gly Ser Ile Lys Lys Val Tyr Ile Trp Thr Asp Gln Asp							
		195		200		205	
aaa ata ttc ctg ccg gac ttc caa cgc tgg caa att gca aac tac aaa	672						
Lys Ile Phe Leu Pro Asp Phe Gln Arg Trp Gln Ile Ala Asn Tyr Lys							
		210		215		220	
ccg gac aag gtt tat cag gtt caa ggc ggc gat cac aag ctg cag ctg	720						
Pro Asp Lys Val Tyr Gln Val Gln Gly Gly Asp His Lys Leu Gln Leu							
		225		230		235	
aca aaa act gaa gaa gta gct cac att ctg caa gaa gtt gct gat gca	768						
Thr Lys Thr Glu Glu Val Ala His Ile Leu Gln Glu Val Ala Asp Ala							
		245		250		255	
tac gct taa	777						
Tyr Ala							

<210> 2
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Manihot esculenta

<400> 2
 Met Val Thr Ala His Phe Val Leu Ile His Thr Ile Cys His Gly Ala
 1 5 10 15
 Trp Ile Trp His Lys Leu Lys Pro Ala Leu Glu Arg Ala Gly His Lys
 20 25 30
 Val Thr Ala Leu Asp Met Ala Ala Ser Gly Ile Asp Pro Arg Gln Ile
 35 40 45
 Glu Gln Ile Asn Ser Phe Asp Glu Tyr Ser Glu Pro Leu Leu Thr Phe
 50 55 60
 Leu Glu Lys Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Ile Ile Val Gly Glu Ser
 65 70 75 80
 Cys Ala Gly Leu Asn Ile Ala Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Val Asp Lys
 85 90 95
 Ile Ala Ala Gly Val Phe His Asn Ser Leu Leu Pro Asp Thr Val His
 100 105 110
 Ser Pro Ser Tyr Thr Val Glu Lys Leu Leu Glu Ser Phe Pro Asp Trp
 115 120 125
 Arg Asp Thr Glu Tyr Phe Thr Phe Thr Asn Ile Thr Gly Glu Thr Ile
 130 135 140
 Thr Thr Met Lys Leu Gly Phe Val Leu Leu Arg Glu Asn Leu Phe Thr
 145 150 155 160
 Lys Cys Thr Asp Gly Glu Tyr Glu Leu Ala Lys Met Val Met Arg Lys
 165 170 175
 Gly Ser Leu Phe Gln Asn Val Leu Ala Gln Arg Pro Lys Phe Thr Glu
 180 185 190
 Lys Gly Tyr Gly Ser Ile Lys Lys Val Tyr Ile Trp Thr Asp Gln Asp
 195 200 205
 Lys Ile Phe Leu Pro Asp Phe Gln Arg Trp Gln Ile Ala Asn Tyr Lys
 210 215 220
 Pro Asp Lys Val Tyr Gln Val Gln Gly Gly Asp His Lys Leu Gln Leu
 225 230 235 240
 Thr Lys Thr Glu Glu Val Ala His Ile Leu Gln Glu Val Ala Asp Ala
 245 250 255
 Tyr Ala

<210> 3
 <211> 774
 <212> DNA
 <213> Hevea brasiliensis

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(774)

<400> 3

atg	gca	ttc	gct	cat	ttt	gtt	ctt	att	cat	acc	ata	tgc	cac	ggt	gca	48
Met	Ala	Phe	Ala	His	Phe	Val	Leu	Ile	His	Thr	Ile	Cys	His	Gly	Ala	
1				5					10					15		

tgg	att	tgg	cac	aag	ctc	aaa	ccc	ctc	ctt	gag	gca	ctt	ggc	cac	aag	96
Trp	Ile	Trp	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	His	Lys	
			20					25					30			

gtt	act	gca	ctg	gac	ctt	gca	gca	agc	ggc	gtt	gac	cca	agg	caa	att	144
Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Leu	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Asp	Pro	Arg	Gln	Ile	
		35					40					45				

gag	gag	att	ggc	tca	ttt	gat	gag	tat	tct	gaa	ccc	ttg	ttg	acg	ttc	192
Glu	Glu	Ile	Gly	Ser	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	Leu	Leu	Thr	Phe	
	50					55					60					

ttg	gag	gca	ctc	cct	cca	ggg	gaa	aag	gtg	att	ctg	gtt	ggc	gag	agc	240
Leu	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Ser	
65					70				75						80	

tgt	gga	gga	ctc	aat	ata	gca	att	gct	gct	gat	aaa	tac	tgt	gaa	aag	288
Cys	Gly	Gly	Leu	Asn	Ile	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Lys	Tyr	Cys	Glu	Lys	
				85					90					95		

att	gca	gct	gct	gtt	ttc	cac	aat	tca	gta	ttg	cca	gac	acc	gag	cac	336
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Phe	His	Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Asp	Thr	Glu	His	
			100					105					110			

tgc	cca	tct	tac	gtc	gtg	gat	aag	ctc	atg	gag	gtg	ttt	ccc	gac	tgg	384
Cys	Pro	Ser	Tyr	Val	Val	Asp	Lys	Leu	Met	Glu	Val	Phe	Pro	Asp	Trp	
		115					120					125				

aaa	gac	acc	acg	tat	ttt	acg	tac	act	aaa	gat	ggc	aag	gag	ata	act	432
Lys	Asp	Thr	Thr	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu	Ile	Thr	
	130					135					140					

gga	ttg	aaa	ctg	ggc	ttc	acg	ctt	ctg	agg	gaa	aat	tta	tat	acc	ctt	480
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Thr	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Leu	Tyr	Thr	Leu	
145					150					155					160	

tgc	ggt	cct	gag	gaa	tat	gaa	ctg	gcg	aag	atg	ttg	aca	agg	aag	gga	528
Cys	Gly	Pro	Glu	Glu	Tyr	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Gly	
				165					170					175		

tca	tta	ttt	caa	aat	att	tta	gct	aag	cga	cca	ttc	ttc	act	aag	gaa	576
Ser	Leu	Phe	Gln	Asn	Ile	Leu	Ala	Lys	Arg	Pro	Phe	Phe	Thr	Lys	Glu	
			180					185							190	

ggt	tac	gga	tcg	att	aag	aaa	att	tat	gtg	tgg	acc	gac	caa	gac	gaa	624
Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Ile	Tyr	Val	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Glu	
		195					200					205				

ata	ttt	tta	cct	gaa	ttt	caa	ctc	tgg	caa	ata	gaa	aac	tat	aaa	cca	672
Ile	Phe	Leu	Pro	Glu	Phe	Gln	Leu	Trp	Gln	Ile	Glu	Asn	Tyr	Lys	Pro	
	210					215					220					

gac	aag	gtt	tat	aag	gtc	gaa	ggg	gga	gat	cat	aaa	ttg	cag	ctt	aca	720
Asp	Lys	Val	Tyr	Lys	Val	Glu	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu	Thr	
225					230					235					240	

aag	act	aag	gag	atc	gct	gaa	att	ctc	caa	gag	gtg	gct	gat	acc	tat	768
Lys	Thr	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Thr	Tyr	
				245					250					255		

aat	tga															774
Asn																

<210> 4
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Hevea brasiliensis

<400> 4																	
Met	Ala	Phe	Ala	His	Phe	Val	Leu	Ile	His	Thr	Ile	Cys	His	Gly	Ala		
1				5					10					15			
Trp	Ile	Trp	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	His	Lys		
			20					25					30				
Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Leu	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Asp	Pro	Arg	Gln	Ile		
		35				40					45						
Glu	Glu	Ile	Gly	Ser	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	Leu	Leu	Thr	Phe		
	50					55				60							
Leu	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Ser		
65				70					75					80			
Cys	Gly	Gly	Leu	Asn	Ile	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Lys	Tyr	Cys	Glu	Lys		
				85				90					95				
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Phe	His	Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Asp	Thr	Glu	His		
		100						105				110					
Cys	Pro	Ser	Tyr	Val	Val	Asp	Lys	Leu	Met	Glu	Val	Phe	Pro	Asp	Trp		
	115						120					125					
Lys	Asp	Thr	Thr	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu	Ile	Thr		
	130					135				140							
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Thr	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Leu	Tyr	Thr	Leu		
145				150					155						160		
Cys	Gly	Pro	Glu	Glu	Tyr	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Gly		
			165					170					175				
Ser	Leu	Phe	Gln	Asn	Ile	Leu	Ala	Lys	Arg	Pro	Phe	Phe	Thr	Lys	Glu		
			180					185					190				

Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Ile	Tyr	Val	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Glu	
		195					200					205				
Ile	Phe	Leu	Pro	Glu	Phe	Gln	Leu	Trp	Gln	Ile	Glu	Asn	Tyr	Lys	Pro	
	210					215					220					
Asp	Lys	Val	Tyr	Lys	Val	Glu	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Lys	Thr	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Thr	Tyr	
				245					250					255		

Asn

<210> 5
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Manihot esculenta

<220>
 <223> cDNA coding for Modified SHNL involving
 a replacement of Gly by Asp at position 165

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (777)

<400> 5

atg gtt act gca cac ttc gtt ctg att cac acc att tgt cac ggc gca	48
Met Val Thr Ala His Phe Val Leu Ile His Thr Ile Cys His Gly Ala	
1 5 10 15	
tgg att tgg cac aaa ctg aaa ccg gcc ctg gaa cgt gct ggc cac aaa	96
Trp Ile Trp His Lys Leu Lys Pro Ala Leu Glu Arg Ala Gly His Lys	
20 25 30	
gtt act gca ctg gac atg gca gcc agt ggc att gac ccg cgt caa att	144
Val Thr Ala Leu Asp Met Ala Ala Ser Gly Ile Asp Pro Arg Gln Ile	
35 40 45	
gaa cag atc aac tct ttc gat gaa tac tct gaa ccg ctg ctg act ttc	192
Glu Gln Ile Asn Ser Phe Asp Glu Tyr Ser Glu Pro Leu Leu Thr Phe	
50 55 60	
ctg gaa aaa ctg ccg caa ggc gaa aag gtt atc att gtt ggt gaa agc	240
Leu Glu Lys Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Ile Ile Val Gly Glu Ser	
65 70 75 80	
tgt gca ggc ctg aac att gct att gct gct gat cgt tac gtt gac aaa	288
Cys Ala Gly Leu Asn Ile Ala Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Val Asp Lys	
85 90 95	

att gca gct ggc gtt ttc cac aac tcc ctg ctg ccg gac acc gtt cac	336
Ile Ala Ala Gly Val Phe His Asn Ser Leu Leu Pro Asp Thr Val His	
100 105 110	
agc ccg tct tac act gtt gaa aag ctg ctg gaa tcg ttc ccg gac tgg	384
Ser Pro Ser Tyr Thr Val Glu Lys Leu Leu Glu Ser Phe Pro Asp Trp	
115 120 125	
cgt gac aca gaa tat ttc acg ttc acc aac atc act ggc gaa acc atc	432
Arg Asp Thr Glu Tyr Phe Thr Phe Thr Asn Ile Thr Gly Glu Thr Ile	
130 135 140	
act acc atg aaa ctg ggt ttc gtt ctg ctg cgt gaa aac ctg ttc acc	480
Thr Thr Met Lys Leu Gly Phe Val Leu Leu Arg Glu Asn Leu Phe Thr	
145 150 155 160	
aaa tgc act gat gac gaa tat gaa ctg gca aaa atg gtt atg cgc aag	528
Lys Cys Thr Asp Asp Glu Tyr Glu Leu Ala Lys Met Val Met Arg Lys	
165 170 175	
ggc tct ctg ttc caa aac gtt ctg gct cag cgt ccg aag ttc act gaa	576
Gly Ser Leu Phe Gln Asn Val Leu Ala Gln Arg Pro Lys Phe Thr Glu	
180 185 190	
aaa ggc tac ggc tct atc aag aaa gtt tat att tgg acc gat caa gac	624
Lys Gly Tyr Gly Ser Ile Lys Lys Val Tyr Ile Trp Thr Asp Gln Asp	
195 200 205	
aaa ata ttc ctg ccg gac ttc caa cgc tgg caa att gca aac tac aaa	672
Lys Ile Phe Leu Pro Asp Phe Gln Arg Trp Gln Ile Ala Asn Tyr Lys	
210 215 220	
ccg gac aag gtt tat cag gtt caa ggc ggc gat cac aag ctg cag ctg	720
Pro Asp Lys Val Tyr Gln Val Gln Gly Gly Asp His Lys Leu Gln Leu	
225 230 235 240	
aca aaa act gaa gaa gta gct cac att ctg caa gaa gtt gct gat gca	768
Thr Lys Thr Glu Glu Val Ala His Ile Leu Gln Glu Val Ala Asp Ala	
245 250 255	
tac gct taa	777
Tyr Ala	

<210> 6

<211> 258

<212> PRT

<213> Manihot esculenta

<220>

<223> Modified SHNL involving
a replacement of Gly by Asp at position 165

<400> 6

Met	Val	Thr	Ala	His	Phe	Val	Leu	Ile	His	Thr	Ile	Cys	His	Gly	Ala
1				5					10					15	
Trp	Ile	Trp	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Gly	His	Lys
			20					25					30		
Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Gln	Ile
		35					40					45			
Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	Leu	Leu	Thr	Phe
	50					55					60				
Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Gln	Gly	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Val	Gly	Glu	Ser
65					70					75					80
Cys	Ala	Gly	Leu	Asn	Ile	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Phe	His	Asn	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Val	His
			100					105					110		
Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Phe	Pro	Asp	Trp
		115					120					125			
Arg	Asp	Thr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Thr	Gly	Glu	Thr	Ile
	130					135					140				
Thr	Thr	Met	Lys	Leu	Gly	Phe	Val	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Leu	Phe	Thr
145					150					155					160
Lys	Cys	Thr	Asp	Asp	Glu	Tyr	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Val	Met	Arg	Lys
			165						170				175		
Gly	Ser	Leu	Phe	Gln	Asn	Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Pro	Lys	Phe	Thr	Glu
			180					185					190		
Lys	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Tyr	Ile	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp
		195					200					205			
Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Asp	Phe	Gln	Arg	Trp	Gln	Ile	Ala	Asn	Tyr	Lys
	210					215					220				
Pro	Asp	Lys	Val	Tyr	Gln	Val	Gln	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu
225					230					235					240
Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Ala
			245						250					255	

Tyr Ala

<210> 7

<211> 777

<212> DNA

<213> Manihot esculenta

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<220>

<223> cDNA coding for Modified SHNL involving
a replacement of Gly by Glu at position 165

<400> 7

atg gtt act gca cac ttc gtt ctg att cac acc att tgt cac ggc gca	48
Met Val Thr Ala His Phe Val Leu Ile His Thr Ile Cys His Gly Ala	
1 5 10 15	
tgg att tgg cac aaa ctg aaa ccg gcc ctg gaa cgt gct ggc cac aaa	96
Trp Ile Trp His Lys Leu Lys Pro Ala Leu Glu Arg Ala Gly His Lys	
20 25 30	
gtt act gca ctg gac atg gca gcc agt ggc att gac ccg cgt caa att	144
Val Thr Ala Leu Asp Met Ala Ala Ser Gly Ile Asp Pro Arg Gln Ile	
35 40 45	
gaa cag atc aac tct ttc gat gaa tac tct gaa ccg ctg ctg act ttc	192
Glu Gln Ile Asn Ser Phe Asp Glu Tyr Ser Glu Pro Leu Leu Thr Phe	
50 55 60	
ctg gaa aaa ctg ccg caa ggc gaa aag gtt atc att gtt ggt gaa agc	240
Leu Glu Lys Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Ile Ile Val Gly Glu Ser	
65 70 75 80	
tgt gca ggc ctg aac att gct att gct gct gat cgt tac gtt gac aaa	288
Cys Ala Gly Leu Asn Ile Ala Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Val Asp Lys	
85 90 95	
att gca gct ggc gtt ttc cac aac tcc ctg ctg ccg gac acc gtt cac	336
Ile Ala Ala Gly Val Phe His Asn Ser Leu Leu Pro Asp Thr Val His	
100 105 110	
agc ccg tct tac act gtt gaa aag ctg ctg gaa tcg ttc ccg gac tgg	384
Ser Pro Ser Tyr Thr Val Glu Lys Leu Leu Glu Ser Phe Pro Asp Trp	
115 120 125	
cgt gac aca gaa tat ttc acg ttc acc aac atc act ggc gaa acc atc	432
Arg Asp Thr Glu Tyr Phe Thr Phe Thr Asn Ile Thr Gly Glu Thr Ile	
130 135 140	
act acc atg aaa ctg ggt ttc gtt ctg ctg cgt gaa aac ctg ttc acc	480
Thr Thr Met Lys Leu Gly Phe Val Leu Leu Arg Glu Asn Leu Phe Thr	
145 150 155 160	
aaa tgc act gat gaa gaa tat gaa ctg gca aaa atg gtt atg cgc aag	528
Lys Cys Thr Asp Glu Glu Tyr Glu Leu Ala Lys Met Val Met Arg Lys	
165 170 175	
ggc tct ctg ttc caa aac gtt ctg gct cag cgt ccg aag ttc act gaa	576
Gly Ser Leu Phe Gln Asn Val Leu Ala Gln Arg Pro Lys Phe Thr Glu	

180

185

190

aaa	ggc	tac	ggc	tct	atc	aag	aaa	gtt	tat	att	tgg	acc	gat	caa	gac	624
Lys	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Tyr	Ile	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	
		195					200					205				

aaa	ata	ttc	ctg	ccg	gac	ttc	caa	cgc	tgg	caa	att	gca	aac	tac	aaa	672
Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Asp	Phe	Gln	Arg	Trp	Gln	Ile	Ala	Asn	Tyr	Lys	
	210						215				220					

ccg	gac	aag	gtt	tat	cag	gtt	caa	ggc	ggc	gat	cac	aag	ctg	cag	ctg	720
Pro	Asp	Lys	Val	Tyr	Gln	Val	Gln	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu	
225					230					235					240	

aca	aaa	act	gaa	gaa	gta	gct	cac	att	ctg	caa	gaa	gtt	gct	gat	gca	768
Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Ala	
			245						250					255		

tac	gct	taa														777
Tyr	Ala															

<210> 8

<211> 258

<212> PRT

<213> Manihot esculenta

<220>

<223> Modified SHNL involving

a replacement of Gly by Glu at position 165

<400> 8

Met	Val	Thr	Ala	His	Phe	Val	Leu	Ile	His	Thr	Ile	Cys	His	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Trp	Ile	Trp	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Gly	His	Lys	
			20					25					30			
Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Gln	Ile	
		35				40					45					
Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	Leu	Leu	Thr	Phe	
	50					55					60					
Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Gln	Gly	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Val	Gly	Glu	Ser	
65					70					75					80	
Cys	Ala	Gly	Leu	Asn	Ile	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Asp	Lys	
				85					90					95		
Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Phe	His	Asn	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Val	His	
		100					105					110				
Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Phe	Pro	Asp	Trp	
		115					120					125				
Arg	Asp	Thr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Thr	Gly	Glu	Thr	Ile	
	130						135					140				

Thr	Thr	Met	Lys	Leu	Gly	Phe	Val	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Leu	Phe	Thr
145					150					155					160
Lys	Cys	Thr	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Val	Met	Arg	Lys
			165						170					175	
Gly	Ser	Leu	Phe	Gln	Asn	Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Pro	Lys	Phe	Thr	Glu
			180					185					190		
Lys	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Tyr	Ile	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp
	195						200					205			
Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Asp	Phe	Gln	Arg	Trp	Gln	Ile	Ala	Asn	Tyr	Lys
	210					215					220				
Pro	Asp	Lys	Val	Tyr	Gln	Val	Gln	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu
225					230					235					240
Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Ala
			245						250					255	
Tyr	Ala														

<210> 9
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9
 ggggaattca tggttactgc acacttcggtt ctgattcac 39

<210> 10
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10
 gggaagcttt taagcgatat catcagcaac ttctttgcag 39

<210> 11
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11
gggggggggc atatgggttac tgcacacttc gttctgattc acac 44

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12
gggggatcct taagcgatat catcagcaac ttcttgacag 39

<210> 13
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13
cgtgaaaacc tggtcaccaa atgcactgat gaagaatatg aactggcaaa aatg 54

<210> 14
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14
catttttgcc agttcatatt ctcatcagt gcatttggtg aacaggtttt cacg 54

<210> 15
<211> 777
<212> DNA
<213> Manihot esculenta

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (777)

<220>

<223> cDNA coding for Modified SHNL involving
a replacement of Val by Leu at position 173

<400> 15

atg gtt act gca cac ttc gtt ctg att cac acc att tgt cac ggc gca	48
Met Val Thr Ala His Phe Val Leu Ile His Thr Ile Cys His Gly Ala	
1 5 10 15	
tgg att tgg cac aaa ctg aaa ccg gcc ctg gaa cgt gct ggc cac aaa	96
Trp Ile Trp His Lys Leu Lys Pro Ala Leu Glu Arg Ala Gly His Lys	
20 25 30	
gtt act gca ctg gac atg gca gcc agt ggc att gac ccg cgt caa att	144
Val Thr Ala Leu Asp Met Ala Ala Ser Gly Ile Asp Pro Arg Gln Ile	
35 40 45	
gaa cag atc aac tct ttc gat gaa tac tct gaa ccg ctg ctg act ttc	192
Glu Gln Ile Asn Ser Phe Asp Glu Tyr Ser Glu Pro Leu Leu Thr Phe	
50 55 60	
ctg gaa aaa ctg ccg caa ggc gaa aag gtt atc att gtt ggt gaa agc	240
Leu Glu Lys Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Ile Ile Val Gly Glu Ser	
65 70 75 80	
tgt gca ggc ctg aac att gct att gct gct gat cgt tac gtt gac aaa	288
Cys Ala Gly Leu Asn Ile Ala Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Val Asp Lys	
85 90 95	
att gca gct ggc gtt ttc cac aac tcc ctg ctg ccg gac acc gtt cac	336
Ile Ala Ala Gly Val Phe His Asn Ser Leu Leu Pro Asp Thr Val His	
100 105 110	
agc ccg tct tac act gtt gaa aag ctg ctg gaa tcg ttc ccg gac tgg	384
Ser Pro Ser Tyr Thr Val Glu Lys Leu Leu Glu Ser Phe Pro Asp Trp	
115 120 125	
cgt gac aca gaa tat ttc acg ttc acc aac atc act ggc gaa acc atc	432
Arg Asp Thr Glu Tyr Phe Thr Phe Thr Asn Ile Thr Gly Glu Thr Ile	
130 135 140	
act acc atg aaa ctg ggt ttc gtt ctg ctg cgt gaa aac ctg ttc acc	480
Thr Thr Met Lys Leu Gly Phe Val Leu Leu Arg Glu Asn Leu Phe Thr	
145 150 155 160	
aaa tgc act gat ggc gaa tat gaa ctg gca aaa atg ctg atg cgc aag	528
Lys Cys Thr Asp Gly Glu Tyr Glu Leu Ala Lys Met Leu Met Arg Lys	
165 170 175	
ggc tct ctg ttc caa aac gtt ctg gct cag cgt ccg aag ttc act gaa	576
Gly Ser Leu Phe Gln Asn Val Leu Ala Gln Arg Pro Lys Phe Thr Glu	

180

185

190

aaa	ggc	tac	ggc	tct	atc	aag	aaa	gtt	tat	att	tgg	acc	gat	caa	gac	624
Lys	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Tyr	Ile	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	
		195					200					205				

aaa	ata	ttc	ctg	ccg	gac	ttc	caa	cgc	tgg	caa	att	gca	aac	tac	aaa	672
Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Asp	Phe	Gln	Arg	Trp	Gln	Ile	Ala	Asn	Tyr	Lys	
	210						215				220					

ccg	gac	aag	gtt	tat	cag	gtt	caa	ggc	ggc	gat	cac	aag	ctg	cag	ctg	720
Pro	Asp	Lys	Val	Tyr	Gln	Val	Gln	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu	
225					230					235					240	

aca	aaa	act	gaa	gaa	gta	gct	cac	att	ctg	caa	gaa	gtt	gct	gat	gca	768
Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Ala	
			245						250					255		

tac	gct	taa														777
Tyr	Ala															

<210> 16

<211> 258

<212> PRT

<213> Manihot esculenta

<220>

<223> Modified SHNL involving

a replacement of Val by Leu at position 173

<400> 16

Met	Val	Thr	Ala	His	Phe	Val	Leu	Ile	His	Thr	Ile	Cys	His	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Trp	Ile	Trp	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Gly	His	Lys	
			20					25					30			
Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Gln	Ile	
		35				40					45					
Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	Leu	Leu	Thr	Phe	
	50					55					60					
Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Gln	Gly	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Val	Gly	Glu	Ser	
65					70					75					80	
Cys	Ala	Gly	Leu	Asn	Ile	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Asp	Lys	
				85					90					95		
Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Phe	His	Asn	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Val	His	
			100					105				110				
Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Phe	Pro	Asp	Trp	
		115					120					125				
Arg	Asp	Thr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Thr	Gly	Glu	Thr	Ile	
	130						135					140				

Thr	Thr	Met	Lys	Leu	Gly	Phe	Val	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Leu	Phe	Thr
145					150					155					160
Lys	Cys	Thr	Asp	Gly	Glu	Tyr	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Leu	Met	Arg	Lys
				165					170					175	
Gly	Ser	Leu	Phe	Gln	Asn	Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Pro	Lys	Phe	Thr	Glu
			180					185					190		
Lys	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Tyr	Ile	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp
		195					200					205			
Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Asp	Phe	Gln	Arg	Trp	Gln	Ile	Ala	Asn	Tyr	Lys
	210					215					220				
Pro	Asp	Lys	Val	Tyr	Gln	Val	Gln	Gly	Gly	Asp	His	Lys	Leu	Gln	Leu
225					230					235					240
Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Val	Ala	Asp	Ala
				245					250					255	
Tyr	Ala														

<210> 17
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

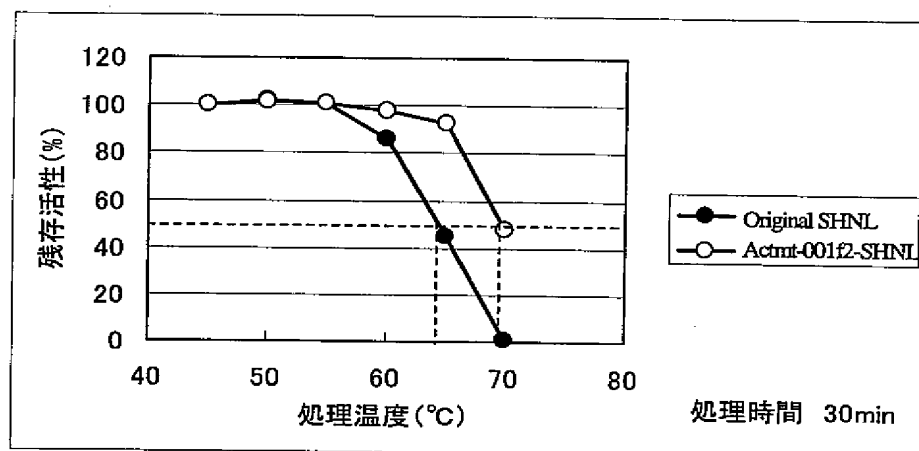
<400> 17
 ggcgaaatatg aactggcaaa aatgnnnatg cgcaagggct ctctg 45

<210> 18
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

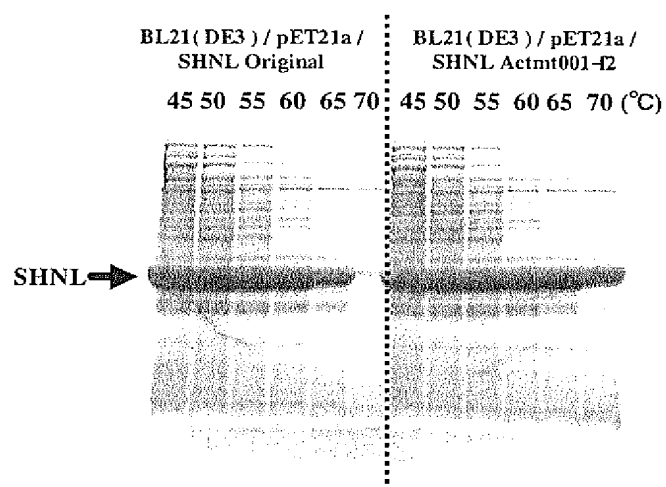
<400> 18
 cagagagccc ttgcgcatnn ncattttttgc cagttcatat tcgcc 45

熱に対する安定性の比較



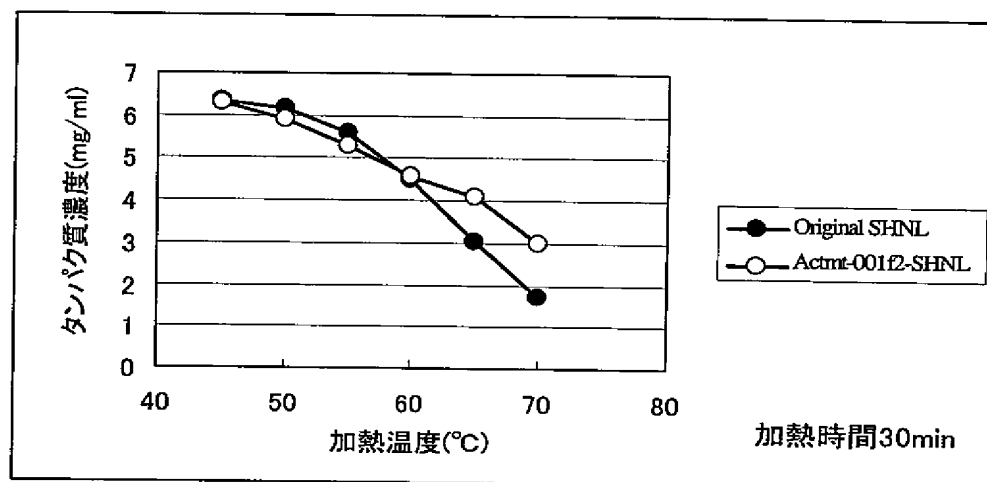
【図 2】

SDS-PAGE による加熱処理サンプルの解析



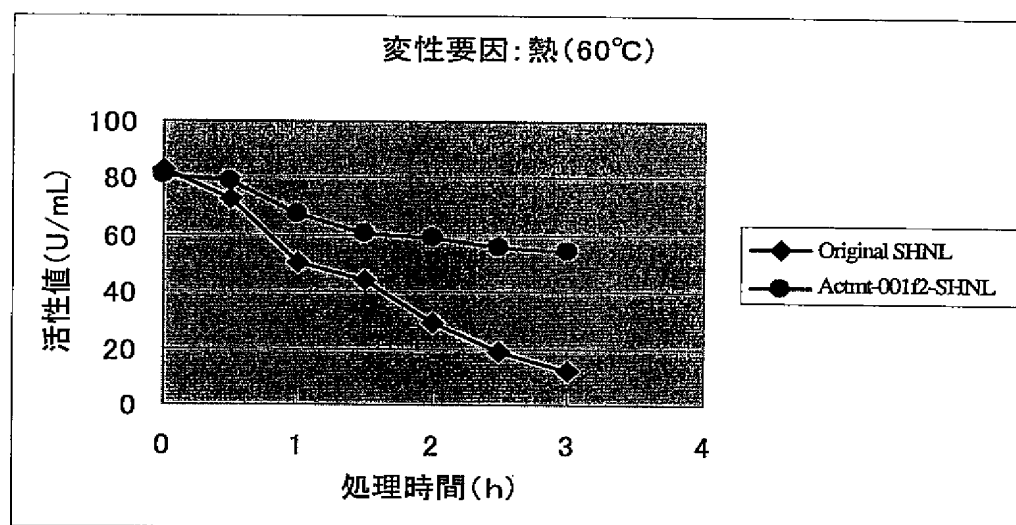
【図 3】

加熱処理サンプル中のタンパク質濃度の変化

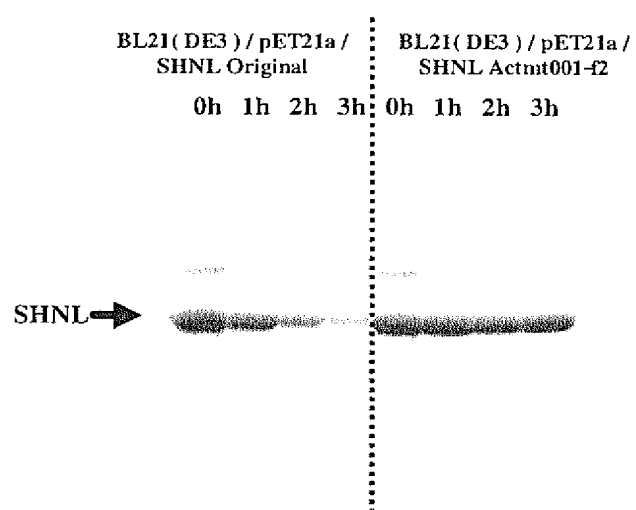


【図 4】

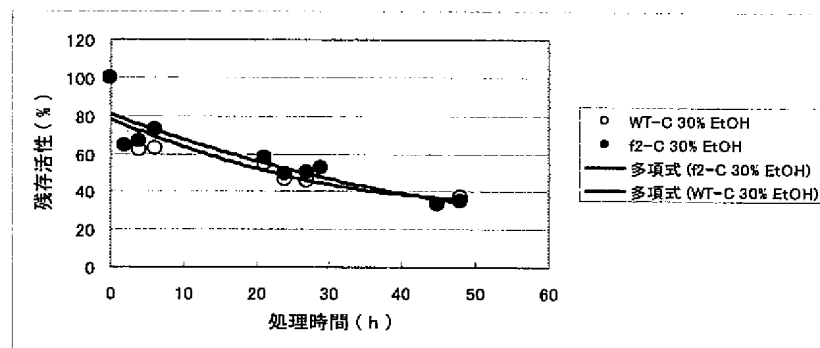
熱に対する安定性の比較



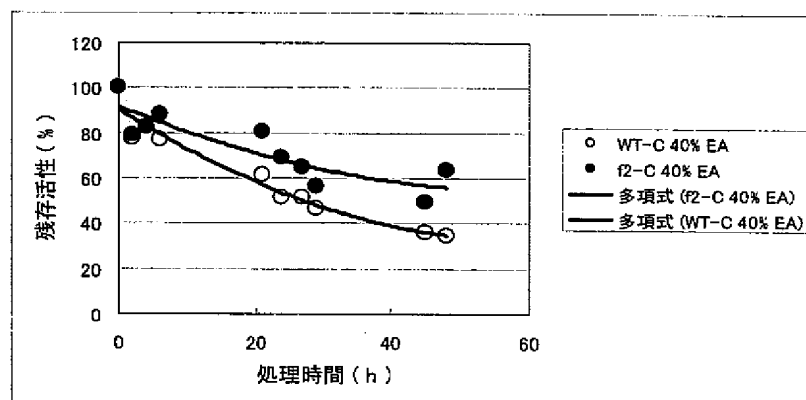
加熱処理サンプル（上清）の SDS-PAGE



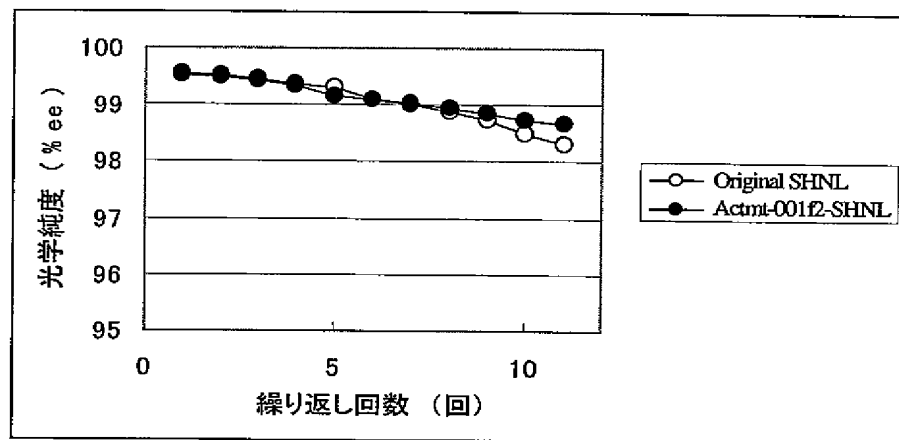
A Actmt-001f2-SHNL のエタノールに対する耐性



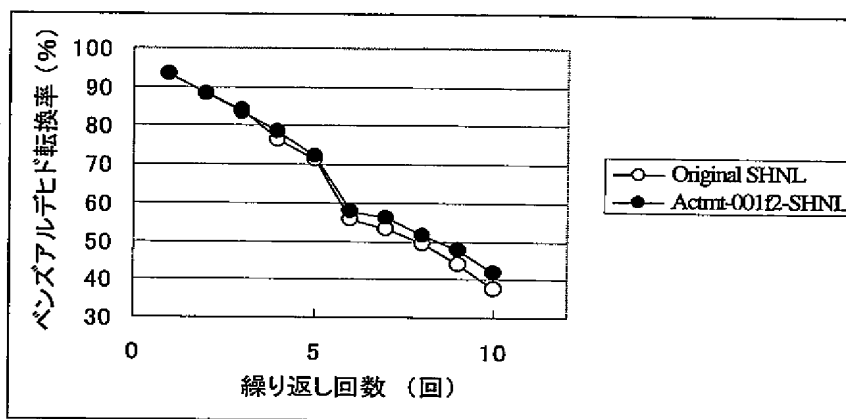
B Actmt-001f2-SHNL の酢酸エチルに対する耐性



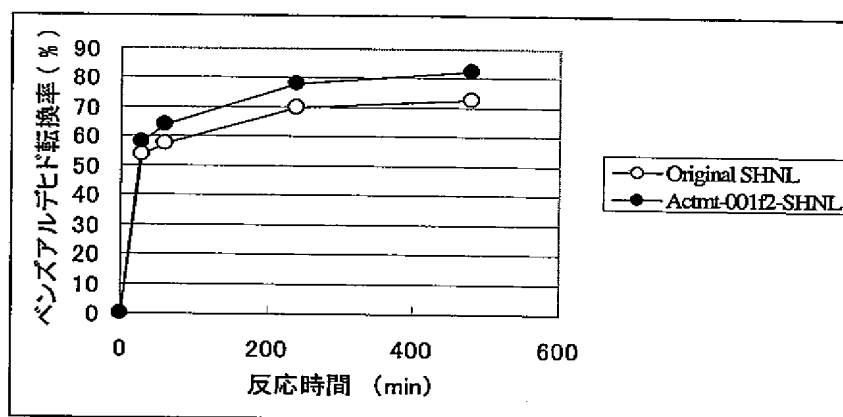
繰り返し反応における反応 1 時間目の光学純度



A 繰り返し反応における反応 1 時間目のベンズアルデヒド転換率

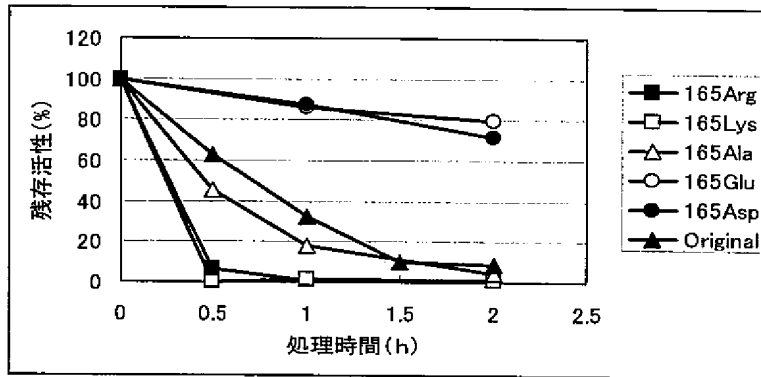


B 繰り返し反応 1 1 回目におけるベンズアルデヒド転換率の経時変化

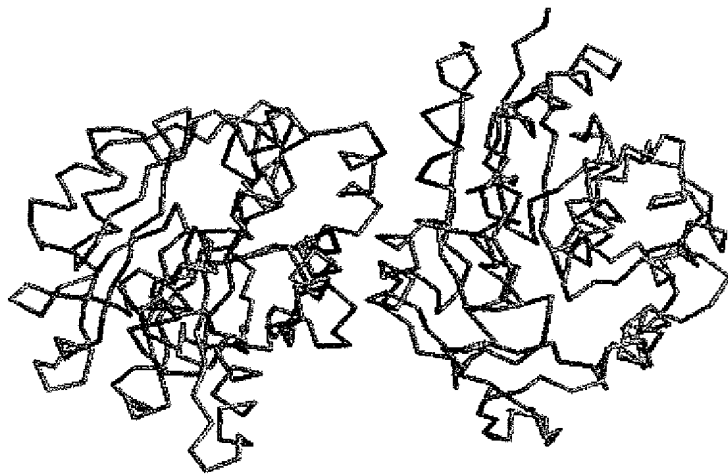


【図 9】

種々の改変型 SHNL の加熱による酵素活性の変化

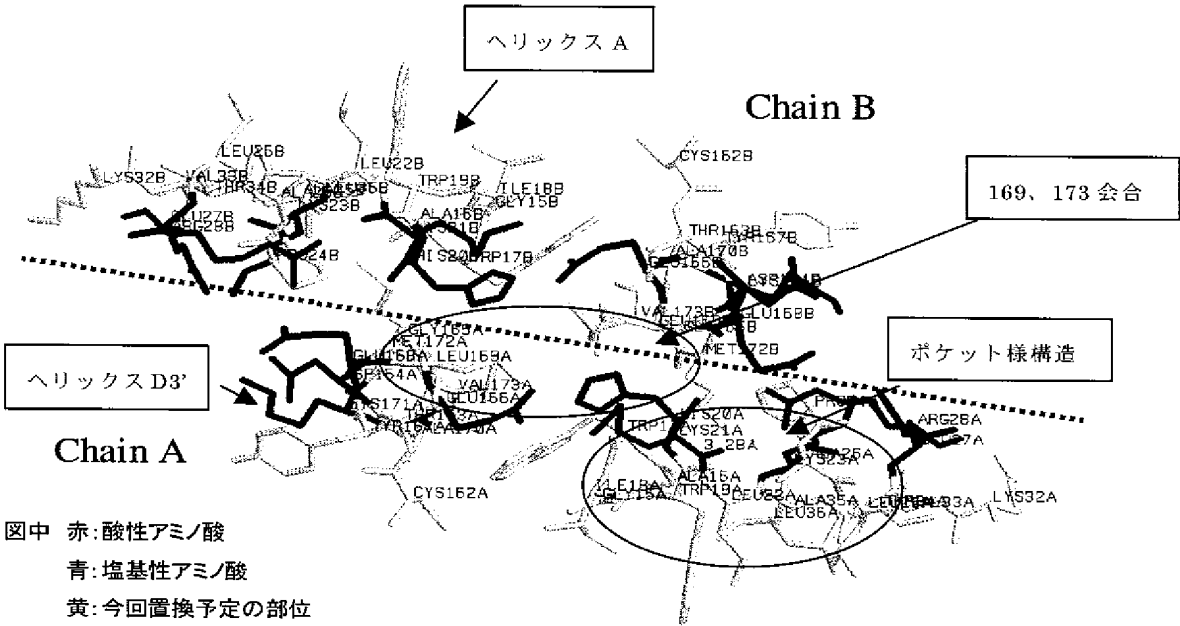


【図 10】



SHNL の三次元構造

図中赤：165Gly 黒：21Lys

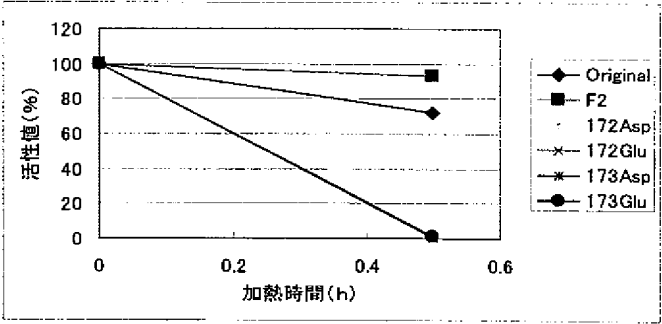


SHNL dimer の結合部位におけるアミノ酸側鎖配置図

SHNL の Dimer 形成部位

図中 赤：酸性アミノ酸 青：塩基性アミノ酸

種々の改変型 SHNL の耐熱性



【図 1 3】

```

Hevea brasiliensis 1:MAFAHFVLIHTICHGAWIWHKLPLEALGHKVTALDLAASGVDPQRQIEEIGSFDEYSEP 60
Manihot esculenta 1:MVTAHFVLIHTICHGAWIWHKLPALERAGHKVTALDMAASGIDPRQIEQINSFDEYSEP 60
      * * * * *

Hevea brasiliensis 51:LLTFLEALPPGEKVILVGESCGGLNIAIAADKYCEKIAAAVFHNSVLPDTEHCPSYVVDK 120
Manihot esculenta 51:LLTFLEKLPQGEKVIIVGESGAGLNIAIAADRYVDKIAAGVFHNSLLPDTVHSPSYTVEK 120
      * * * * *

Hevea brasiliensis 121:LMEVFPDWKDTTYFTYTKDGKE-ITGLKLGFTLLRENLYTLGPEEYELAKMLTRKGS LF 179
Manihot esculenta 121:LLESFPDWRDTEYFTFTNITGETITTMKLG FVLLRENLF TKCTDGEYELAKMVMRKGS LF 180
      * * * * *

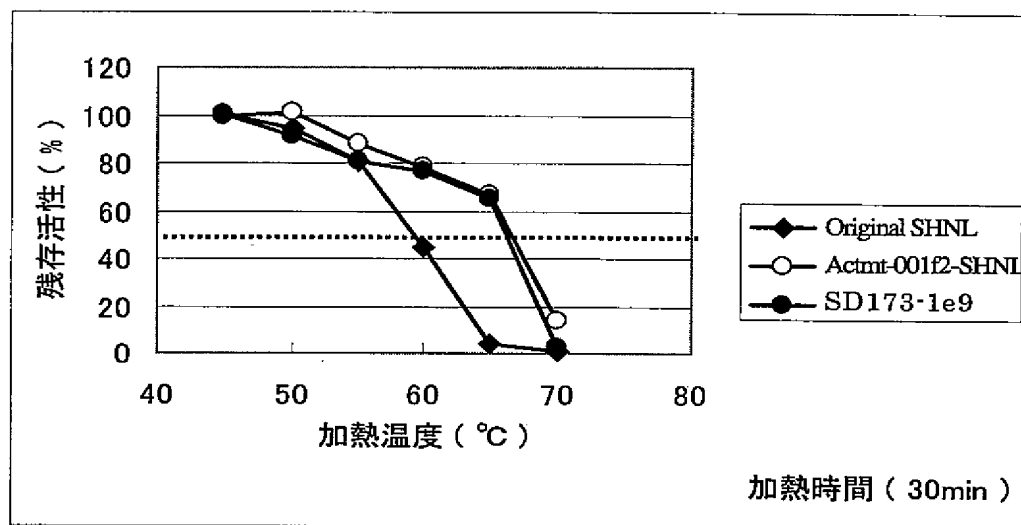
Hevea brasiliensis 180:QNILAKRPFFTKEGYGSIKKIYVWTDQDEIFLPEFQLWQIENYKPKVKYKVEGGDHKLQL 239
Manihot esculenta 181:QNVLAQRPKFTEKGYGSIKKVYIWDQDKIFLPDFQRWQIANYKPKVKYQVQGGDHKLQL 240
      * * * * *

Hevea brasiliensis 240:TKTKEIAEILQE VADTYN 257
Manihot esculenta 241:TKTEEVAHILQE VADAYA 258
      * * * * *

```

【図 1 4】

熱に対する安定性の比較



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 耐熱性の向上したS-ヒドロキシニトリルリアーゼを提供すること。

【解決手段】 天然型S-ヒドロキシニトリルリアーゼのアミノ酸配列において、ヘリックスD3'、ヘリックスA、および β シート2領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸を改変して得られる、改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【選択図】 図1

【書類名】	手続補正書
【整理番号】	P04-0114
【提出日】	平成16年 5月 27日
【あて先】	特許庁長官 殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2004-105642
【補正をする者】	
【識別番号】	000004628
【氏名又は名称】	株式会社日本触媒
【補正をする者】	
【識別番号】	301037213
【氏名又は名称】	独立行政法人製品評価技術基盤機構
【代理人】	
【識別番号】	100091096
【弁理士】	
【氏名又は名称】	平木 祐輔
【発送番号】	049891
【手続補正1】	
【補正対象書類名】	特許願
【補正対象項目名】	提出物件の目録
【補正方法】	追加
【補正の内容】	
【提出物件の目録】	
【物件名】	持分契約証明書 1

【添付書類】



持分契約証明書

平成16年 3月 31日

特許庁長官 殿

(甲) 住所又は居所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

氏名又は名称 株式会社日本触媒

代 表 者 ~~代表取締役~~ 柳 田 浩



(乙) 住所又は居所 東京都渋谷区西原2-49-10

氏名又は名称 独立行政法人製品評価技術基盤機構

代 表 者 理事長 齋 藤 紘



下記発明の特許を受ける権利について、甲、乙共有のところ、持分契約により、その特許を受ける権利の持分が甲50%、乙50%であることを証明致します。

記

- | | |
|----------|--------------------------|
| 1. 整理番号 | P04-0114 |
| 2. 発明の名称 | 新規耐熱性S-ヒドロキシニトリル
リアーゼ |

以上

出願人履歴

0 0 0 0 0 4 6 2 8

20001206

住所変更

5 9 3 1 4 6 9 6 9

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

株式会社日本触媒

3 0 1 0 3 7 2 1 3

20010530

新規登録

東京都渋谷区西原2-49-10

独立行政法人製品評価技術基盤機構